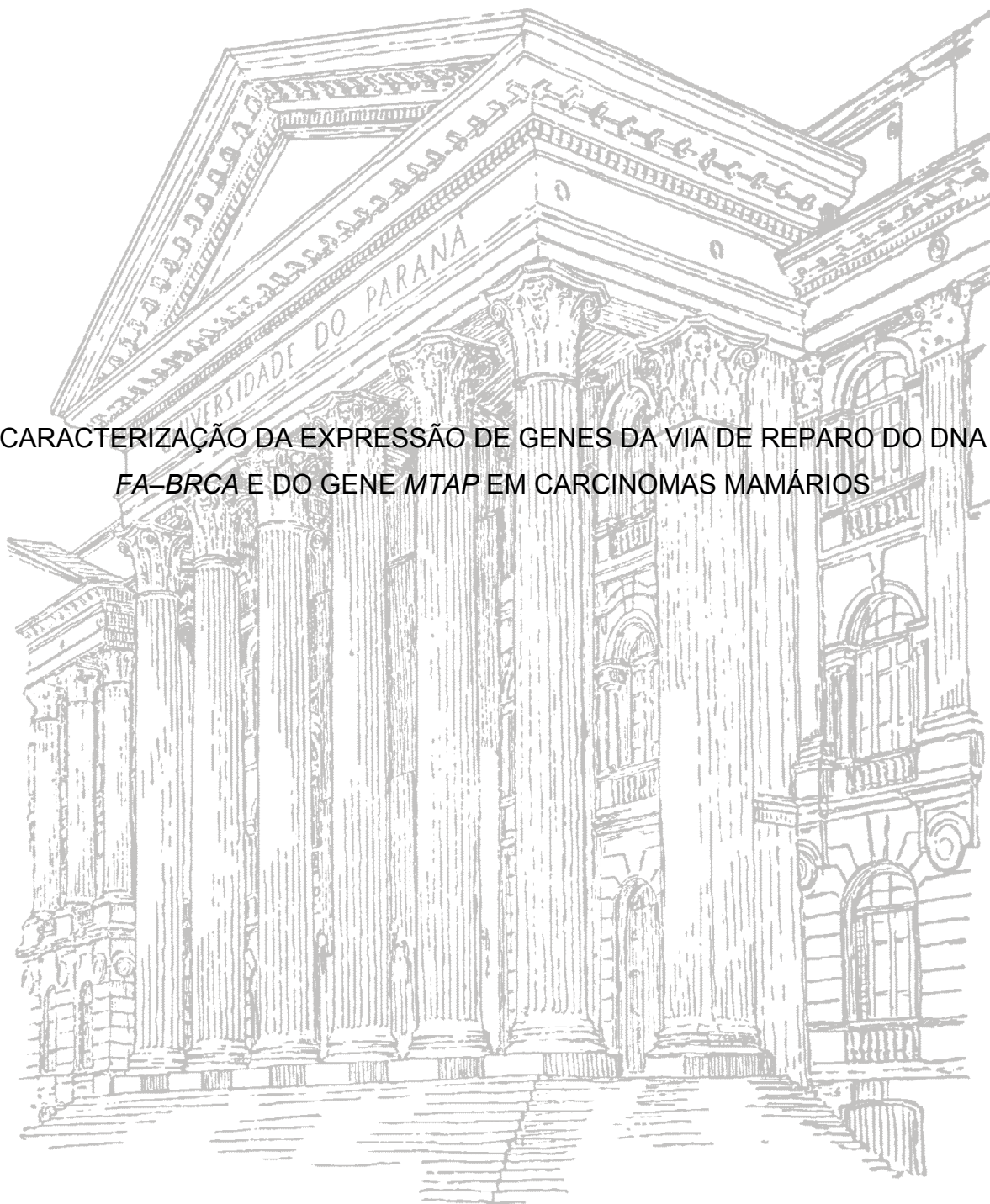


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

SARAH FRANCO VIEIRA DE OLIVEIRA

CARACTERIZAÇÃO DA EXPRESSÃO DE GENES DA VIA DE REPARO DO DNA
FA-BRCA E DO GENE *MTAP* EM CARCINOMAS MAMÁRIOS



CURITIBA

2013

SARAH FRANCO VIEIRA DE OLIVEIRA

CARACTERIZAÇÃO DA EXPRESSÃO DE GENES DA VIA DE REPARO DO DNA
FA-BRCA E DO GENE *MTAP* EM CARCINOMAS MAMÁRIOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Genética, Setor de Ciências Biológicas,
Universidade Federal do Paraná, como requisito
parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências
Biológicas, área de concentração em Genética.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Enilze Maria de Souza
Fonseca Ribeiro
Co-orientador: Prof. Dr. Iglénir João Cavalli

CURITIBA

2013

*Aos meus pais, por tornarem tudo
possível, desde sempre.*

AGRADECIMENTOS

À CAPES, obrigada pelo suporte financeiro, pela bolsa de estudo e possibilidade de estágio no exterior.

À UFPR e Departamento de Genética, obrigada pela possibilidade de ensino superior de qualidade.

À minha orientadora, Prof^ª. Dr^ª. Enilze Ribeiro, obrigada pela excelente orientação, confiança e principalmente pela amizade.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Iglénir João Cavalli, obrigada pela orientação, leitura da tese, pelo carinho e amizade.

À minha banca de acompanhamento e de defesa, Prof^ª. Dr^ª Roseli Wassem, Prof. Dr. Ricardo Lehtonen Rodrigues de Souza, Prof. Dr. Cícero de Andrade Urban, Prof. Dr. Roberto Rosati, Prof^ª. Dr^ª. Deborah Afonso Cornélio, Prof^ª Dr^ª Maria Luiza Petzl-Erler e Prof^ª. Dr^ª. Valéria M. M. Sperandio-Roxo. Obrigada pela disponibilidade, pela atenção prestada, pelas sugestões e pelos comentários.

À Dr^ª Giovanna Damia, obrigada pela disponibilidade e pela orientação.

Aos meus amigos do Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética, obrigada pela amizade, convivência, apoio e colaboração.

Aos meus amigos do *Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri*, obrigada pelo carinho, colaboração, e principalmente pela amizade, tornando minha vivência na Itália inesquecível!

Aos meus sogros, obrigada por todos os conselhos e por me aceitarem na casa e na família de vocês, como se eu fosse uma filha!

Ao Marcos, obrigada por todo o amor, carinho, respeito e felicidade que você me proporciona!

Às minhas amadas irmãs, obrigada por fazerem parte da minha vida e por serem pessoas maravilhosas!

Aos meus pais, obrigada por tudo que vocês fazem por mim, pela orientação de vida que me deram desde a infância, e pelo amor incondicional!

À Deus, obrigada pela minha saúde e força de vontade de seguir em frente!

“A alegria evita mil males e prolonga a vida.”

William Shakespeare

“O que mais surpreende é o homem, pois perde a saúde para juntar dinheiro, depois perde o dinheiro para recuperar a saúde. Vive pensando ansiosamente no futuro, de tal forma que acaba por não viver nem o presente, nem o futuro. Vive como se nunca fosse morrer e morre como se nunca tivesse vivido.”

Dalai Lama

RESUMO

No Brasil os carcinomas mamários são os mais comuns entre as mulheres. O câncer de mama é uma doença heterogênea, cuja classificação é baseada na morfologia celular e na presença de receptores específicos. Esta classificação é útil na predição do prognóstico e no direcionamento do tratamento, e permitiu o desenvolvimento de terapias adjuvantes atualmente em uso na clínica. Estudos revelaram a presença de cinco subtipos intrínsecos de câncer de mama, quanto ao padrão de expressão gênica e às alterações genéticas: luminal-A, luminal-B, *normal-like*, *ERBB2+* e *basal-like* (incluindo-se aqui os tumores triplo negativos -TNBC). Considerando estes padrões de expressão, novas estratégias terapêuticas têm sido sugeridas. A análise da expressão de genes envolvidos nas vias de reparo do DNA e de outros genes importantes ao metabolismo celular, apresenta relevância clínica e para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas. O objetivo principal do trabalho foi analisar a expressão de genes da via de reparo do DNA *FA-BRCA*, e do gene *MTAP*, propondo novas possibilidades terapêuticas em câncer de mama de acordo com o comportamento destes genes em diferentes subtipos tumorais. Foram utilizadas 46 amostras não-parafinizadas de carcinomas primários da mama, dez amostras não-parafinizadas de tecido não-tumoral da mama contralateral, 85 amostras parafinizadas de tumores de mama TNBC, 66 amostras parafinizadas de tumores de mama do grupo Luminal-A e sete linhagens celulares de carcinomas mamários. O gene *FANCD2* foi aproximadamente duas vezes mais expresso no grupo tumoral (36) em relação ao grupo não-tumoral (10), quando se analisou um grupo de carcinomas ductais invasores. As amostras não-parafinizadas foram também classificadas conforme os subtipos intrínsecos do câncer de mama. O gene *BRCA1* foi aproximadamente três vezes menos expresso no grupo Luminal-B (14) em relação ao grupo Luminal-A (23). Nas amostras parafinizadas, o gene *MTAP* se mostrou aproximadamente duas vezes menos expresso no grupo TNBC (85) em relação ao grupo Luminal-A (66). *MTAP* foi inativado em uma linhagem celular que expressa o gene, e foram realizados ensaios citotóxicos com fármacos que interferem na via da biossíntese de poliaminas. As células *MTAP*-negativas apresentaram maior sensibilidade ao fármaco 5'- fluorouracil (5'-FU) em relação às células *MTAP*-positivas. O aumento da expressão gênica de *FANCD2* no grupo tumoral pode ser um indicador da ativação da via, o que contribui para o processo carcinogênico, e também já foi correlacionado com a resistência à ciclofosfamida e outros quimioterápicos. A redução da expressão de *BRCA1* no grupo Luminal-B é considerada um indicador para a escolha de terapias adjuvantes baseadas em cisplatina, e para que tratamentos baseados em taxóis sejam evitados, devido ao maior risco de resistência. Tumores com expressão reduzida de *MTAP*, como o grupo TNBC, são mais sensíveis a inibidores da síntese de poliaminas, como o 5'-FU. Nossos resultados corroboram um esquema terapêutico proposto recentemente para tumores *MTAP*-negativos, baseado no uso de análogos de poliaminas e do substato MTA, sugerindo novas possibilidades terapêuticas para pacientes TNBC. O padrão de expressão dos genes *FANCD2*, *BRCA1* e *MTAP* apresenta forte relevância clínica, influenciando a resposta a diversos fármacos, e também atuando como novos alvos terapêuticos no câncer de mama.

Palavras-chave: Câncer de mama. Expressão gênica. *FA-BRCA*. *MTAP*. Subtipos intrínsecos. Biomarcadores terapêuticos.

ABSTRACT

In Brazil breast carcinomas are the leading cause of cancer among women. Breast cancer is a heterogeneous disease whose classification is based on cell morphology and the presence of specific receptors. This classification is useful in predicting the prognosis and treatment outcome, and allowed the development of adjuvant therapies currently in use. Recently, studies revealed the presence of five intrinsic subtypes of breast cancer, based on the pattern of gene expression and genetic alterations: luminal-A, luminal-B, normal-like, ERBB2+ and basal-like (including triple negative breast cancer - TNBC). Considering these expression patterns, new therapeutic strategies have been suggested. The expression analysis of genes involved in DNA repair pathways, and other genes important in cellular metabolism, has a relevant clinical significance and on the development of new therapeutic strategies. The main objective of this study was to analyze the expression of genes of the *FA-BRCA* DNA repair pathway, and of *MTAP* gene, correlating the results with response to standard therapy and new therapeutic possibilities in breast cancer. The study enrolled 46 fresh primary breast carcinoma samples, ten fresh non-tumoral tissue samples from the contralateral breast, 85 TNBC core-biopsy samples, 66 Luminal-A core-biopsy samples and seven breast cancer cell lines. The *FANCD2* gene was approximately two times more expressed in the tumor group compared to the non-tumor group, when analyzing a group of invasive ductal carcinomas. The fresh samples were also classified in the intrinsic subtypes. The *BRCA1* gene was approximately three times less expressed in Luminal-B group than in Luminal-A group. Regarding paraffin embedded samples, the *MTAP* gene was approximately two times less expressed in TNBC group than in Luminal-A group. *MTAP* was inactivated in a cell line positive to the gene expression, and tests were performed with cytotoxic drugs that interfere with the polyamine biosynthesis pathway. *MTAP*-negative cells showed greater sensitivity to 5'-fluorouracil (5'-FU) in relation to *MTAP*-positive cells. The increased expression of *FANCD2* in tumor samples may be an indicator of the activation of the pathway, which contributes to the carcinogenic process, and has also been correlated with resistance to cyclophosphamide and other chemotherapeutic agents. The loss of *BRCA1* expression in the Luminal-B group is considered an indicator for the choice of adjuvant therapies based on cisplatin, and that taxol based therapies must be avoided, because of the risk of drug resistance. Tumors with reduced expression of *MTAP*, as the TNBC group, are more sensitive to inhibitors of polyamine synthesis, such as 5'-FU. Our results support a recent suggested therapeutic regimen for *MTAP*-negative tumors, based on the use of polyamine analogs and the *MTAP* substrate, MTA; opening new therapeutic possibilities for TNBC patients. The expression of *FANCD2*, *BRCA1* and *MTAP* has strong clinical relevance, influencing the response to different drugs, and also acting as new therapeutic targets in breast cancer.

Keywords: Breast cancer. Gene expression. *FA-BRCA*. *MTAP*. Intrinsic subtypes. Therapeutic biomarkers.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 01 – ALGORÍTMO DE AVALIAÇÃO DO GENE <i>ERBB2</i>	17
QUADRO 01 – CARACTERÍSTICAS DOS SUBTIPOS MOLECULARES DO CÂNCER DE MAMA.....	20
FIGURA 02 – DESENVOLVIMENTO DO EPITÉLIO MAMÁRIO E SUA RELAÇÃO COM OS SUBTIPOS INTRÍNSECOS DO CÂNCER DE MAMA.....	21
FIGURA 03 – TIPOS DE LESÕES NO DNA, AGENTES CAUSADORES E MECANISMOS DE REPARO.....	23
FIGURA 04 – MODELO DE RECOMBINAÇÃO HOMÓLOGA (<i>HR</i>).....	25
FIGURA 05 – INTERAÇÃO DA PROTEÍNA PALB2 COM BRCA1 E BRCA2.....	27
QUADRO 02 – GRUPOS DE COMPLEMENTAÇÃO DA ANEMIA DE FANCONI.....	29
FIGURA 06 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO COMPLEXO PROTÉICO DA VIA <i>FANC-BRCA</i>	30
QUADRO 03 – ESQUEMAS TERAPÊUTICOS UTILIZADOS NO TRATAMENTO ADJUVANTE DO CÂNCER DE MAMA.....	33
FIGURA 07 – VIA METABÓLICA DE MTAP.....	36

LISTA DE ABREVIATURAS

5'-FU	- 5-Fluorouracila
5'-dAdo	- 5-deoxiadenosina
6-4PPs	- fotoprodutos de pirimidina-(6-4)-pirimidona
6-TG	- 6-tioguanina
AC	- doxorrubicina, ciclofosfamida
ACTB	- actina, <i>actin</i>
AMP	- adenina monofosfato
APRT	- adenina fosforibosil-transferase
ATP	- adenina trifosfato
AZA	- 5-Aza-2'-deoxicitidina
B2M	- β -2-microglobulina, <i>β-2-microglobulin</i>
BCNU	- 1,3-bis[2-cloroetil]-1-nitroso-ureia
BER	- reparo por excisão de bases
bp	- <i>base pair</i>
BSA	- <i>albumine bovine serum</i>
CAPES	- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CDKs	- enzimas quinase dependentes de ciclina
CK5/6	- citoqueratinas 5 e 6
CMF	- ciclofosfamida, metotrexato, 5'- fluorouracil
CN	- <i>copy number</i>
CNPq	- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CPDs	- dímeros de pirimidina ciclobutano
Ct	- <i>cycle threshold</i>
D	- docetaxel
DAP	- ácido diaminopimélico
DAPI	- <i>4'.6'-Diamidino-2-Phenilindole</i>
DEB	- diepoxibutano
DFS	- sobrevida livre de doença
dNTP	- dinucleotídeo
DSBs	- quebras de fita dupla no DNA
E	- eficiências de reação da PCR
EBCTCG	- <i>"Early Breast Cancer Clinical Trialists' Collaborative Group"</i>
EC	- epirubicina, ciclofosfamida
EDTA	- <i>ethylenediamine tetraacetic acid</i>
EMT	- transição epitelial-mesenquimal
ER	- receptor de estrogênio
esiRNA	- endoribonuclease-prepared siRNAs
FA	- anemia de Fanconi, <i>Fanconi anemia</i>
FA-BRCA	- via de reparo do DNA da anemia de Fanconi
FAC	- 5'-fluorouracil, doxorrubicina, ciclofosfamida
FC	- <i>fold change</i>
FEC	- 5'-fluorouracil, epirubicina, ciclofosfamida
FISH	- hibridização <i>in situ</i> por fluorescência
FITC	- isotiocianato de fluoresceína, <i>fluorescein isothiocyanate</i>
g	- unidades de gravidade
HC	- Hospital de Clínicas de Curitiba
HCC	- <i>hepatocellular carcinomas</i>
HNSG	- Hospital Nossa Senhora das Graças
HR	- recombinação homóloga
IA	- inibidores de aromatase
ICL	- ligações cruzadas no DNA
IDC	- carcinoma ductal invasor
IHC	- <i>imunohistochemistry</i>
IHQ	- imunohistoquímica
ILC	- carcinoma lobular invasor
IMC	- carcinoma micropapilar invasor

IMF	- imunofluorescência, <i>immunofluorescence</i>
INCA	- Instituto Nacional de Câncer
ISDC	- carcinoma ductal <i>in situ</i>
ISLC	- carcinoma lobular <i>in situ</i>
ITC	- carcinoma tubular invasor
kDa	- quilodalton
LCHO	- Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética
LOH	- perda de heterozigose
MC	- carcinoma mucinoso
MeP	- metaloporfirina
MMC	- <i>mytomycin-C</i>
MMR	- reparo por mal pareamento
MPMs	- <i>malignant pleural mesotheliomas</i>
mRNA	- RNA mensageiro
MSP	- <i>methylation specific PCR</i>
MTA	- 5'-deoxy-5'-methylthioadenosine
MTR-1-P	- 5-methylthioribose-1-fosfato
MTS	- <i>3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium</i>
MTX	- metotrexato
NaCl	- cloreto de sódio
NaF	- fluoreto de sódio
NER	- reparo por excisão de nucleotídeos
NHEJ	- reparo de extremidades não homólogas
NIH	- <i>National Institutes of Health</i>
NP-40	- <i>tergitol-type NP-40</i>
NSCLC	- carcinoma pulmonar de células não pequenas
OMS	- Organização Mundial de Saúde
OS	- sobrevida global
P	- paclitaxel
PARP	- poli (ADP-Ribose) polimerase
pb	- pares de base
PBS	- <i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	- reação em cadeia da polimerase
PPI	- fosforibosil
PR	- receptor de progesterona
PRPP	- fosforibosil-1-pirofosfato
PRT	- fosforibosil-transferase
PSDE	- Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior
PVDF	- <i>polyvinylidene fluoride membranes</i>
RNAi	- RNA de interferência
RPA	- <i>replication protein A1</i>
RQ	- quantificação relativa
RT- qPCR	- PCR quantitativa em tempo real
siRNA	- pequeno RNA de interferência, <i>small interfering RNA</i>
SNP	- polimorfismo de nucleotídeo único
SOE	- sem outra especificação
ssDNA	- DNA simples fita
TBST	- <i>Tris-Buffer-Saline-Tween 20</i>
TC	- taxotere e ciclofosfamida
TLDA	- <i>Taq Man Low Density Array</i>
Tmx	- tamoxifeno
TMZ	- temozolomida
TNBC	- tumor triplo-negativo, <i>triplo negative breast cancer</i>
TNM	- sistema de estadiamento tumoral
TSG	- <i>tumor supressor gene</i>
UFPR	- Universidade Federal do Paraná
UV	- luz ultra-violeta
WB	- <i>western-blotting</i>
XP	- <i>xeroderma pigmentosum</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	11
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	13
2.1 MARCADORES PROGNÓSTICOS E PREDITIVOS DO CÂNCER DE MAMA.....	14
2.2 SUBTIPOS INTRÍNSECOS DO CÂNCER DE MAMA.....	18
2.3 GENES DE REPARO E O CÂNCER DE MAMA.....	22
2.3.1 Reparo de quebras de fita dupla no DNA (<i>DSBs</i>).....	24
2.3.2 Via de reparo da Anemia de Fanconi (<i>FA-BRCA</i>).....	28
2.4 TERAPIAS SISTÊMICAS ADJUVANTES NO CÂNCER DE MAMA.....	33
2.5 O GENE <i>MTAP</i>	34
3 JUSTIFICATIVA.....	37
4 OBJETIVOS.....	38
4.1 OBJETIVO GERAL.....	38
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	38
5 CAPÍTULOS.....	39
5.1 CAPÍTULO I: <i>FANCD2</i> and <i>BRCA1</i> have differential expression among the <i>FA-BRCA</i> genes in breast cancer.....	39
5.2 CAPÍTULO II: <i>MTAP</i> loss of expression in TNBC in relation to Luminal-A breast tumors.....	61
6 DISCUSSÃO.....	83
7 CONCLUSÃO.....	87
REFERÊNCIAS.....	88
APENDICES.....	108

1 INTRODUÇÃO

O câncer é uma doença complexa e heterogênea quanto à sua etiologia. Suas causas dependem de diversos fatores genéticos e ambientais. Se desenvolve por meio de alterações que desencadeiam principalmente a ativação por mutação ou aumento da expressão de proto-oncogenes (FEARON e VOGELSTEIN, 1990), a inativação de genes supressores de tumor (TSGs) (WEINBERG, 1991), alterações nos genes de reparo de danos no DNA (HOEIJMAKERS, 2001), instabilidades cromossômicas (LENGAUER *et al.*, 1998), a reativação da enzima telomerase (GREIDER e BLACKBURN, 1995) e alterações epigenéticas (ROUNTREE *et al.*, 2001).

A perda da expressão de TSGs é de grande importância para o desenvolvimento do câncer, e pode ocorrer por uma variedade de eventos genéticos, como desbalanços alélicos, mutações e metilação na região promotora do gene (KIM *et al.*, 2011). Estas alterações podem ter origem endógena, ou ocorrerem por ação de agentes externos, aos quais os organismos estão constantemente em contato, como agentes carcinogênicos e mutagênicos. Nesse contexto, o sistema de reparo de danos no DNA é fundamental para a manutenção da integridade do genoma, evitando o acúmulo de lesões no DNA que desencadeariam as alterações listadas. Por outro lado, a indução e acúmulo destas lesões no DNA também é uma importante estratégia terapêutica, com a utilização de drogas quimioterápicas nos tratamentos neo-adjuvante e adjuvante de tumores como os de mama, levando à morte das células cancerosas e regressão tumoral.

A análise da expressão de TSGs, como o gene que codifica a enzima metil-tio-adenosina fosforilase (*MTAP*), e de genes que atuam nas vias de reparo do DNA, como a via da anemia de Fanconi (*FA-BRCA*), em amostras tumorais e não tumorais apresenta relevância investigativa e clínica, sugerindo os fatores relacionados à progressão tumoral e estratégias terapêuticas adequadas.

Genes de vias de reparo do DNA encontrados super expressos em alguns tumores sugerem que estratégias terapêuticas (quimioterápicos) que induzem lesões reparadas por estas vias não sejam adequadas para estes pacientes, uma vez que estas lesões seriam mais eficientemente reparadas. Por outro lado, genes pouco expressos em tumores em relação ao tecido não tumoral indicam os possíveis

fatores relacionados à progressão tumoral, úteis no desenvolvimento de novas terapias moleculares mais específicas, eficientes e com menos efeitos colaterais.

Este trabalho foi organizado em uma revisão sobre os assuntos gerais que foram abordados, justificativa, objetivos e dois capítulos, na forma de artigos científicos em língua inglesa, que analisam e discutem os resultados referentes aos genes da via *FA-BRCA* e ao gene *MTAP*. Por fim será apresentada uma discussão geral dos assuntos, conclusões, referências bibliográficas e os materiais e métodos utilizados.

2 REVISÃO DA LITERATURA

O câncer de mama é uma doença frequente de elevada incidência mundial. Mais de um milhão de mulheres são diagnosticadas por ano em todo o mundo e 410.000 vão a óbito em decorrência desta malignidade, o que representa 14% dos óbitos de mulheres por câncer (COUGHLIN e EKWUEME, 2009). No Brasil, é a principal causa de câncer entre mulheres, com uma incidência estimada de 52 casos a cada 100 mil habitantes (INCA, 2012). Apesar de ser considerado de bom prognóstico se diagnosticado e tratado precocemente, as taxas de mortalidade por esta doença continuam elevadas no Brasil, provavelmente pelo fato de ser normalmente diagnosticada em estágios avançados da progressão tumoral (INCA, 2009). Investimentos tecnológicos e em recursos humanos no âmbito de um programa estruturado para detecção precoce desta neoplasia (mamografia, por exemplo), e a implementação de um sistema nacional de informações constituem estratégias importantes para reverter este cenário (INCA, 2008). A mortalidade por câncer de mama tem diminuído nas últimas décadas nos países desenvolvidos, devido a procedimentos de rastreamento, melhorias no manejo local quando em estágio inicial e, principalmente, a introdução de terapias adjuvantes sistêmicas (BERRY *et al.*, 2005).

O carcinoma mamário é bastante heterogêneo e compreende várias doenças associadas com aspectos morfológicos, imunohistoquímicos, clínicos e genéticos específicos. Até recentemente, a sua classificação era baseada na morfologia celular e na presença de vários receptores, principalmente os de estrogênio (ER), progesterona (PR) e a amplificação do oncogene *ERBB2* (*HER2*). Esta classificação mostrou-se útil na predição do prognóstico e no direcionamento do tratamento adjuvante com o antiestrógeno tamoxifeno para pacientes ER ou PR positivas pela imunohistoquímica (IHQ), ou com o anticorpo monoclonal humanizado trastuzumabe para pacientes com amplificação ou super expressão do oncogene *ERBB2* (MULLAN e MILLIKAN, 2007).

2.1 MARCADORES PROGNÓSTICOS E PREDITIVOS DO CÂNCER DE MAMA

Indicadores prognósticos são dados obtidos do paciente no momento do diagnóstico de câncer, e que estão relacionados ou predizem o desenvolvimento clínico, sem relação com a terapia adjuvante. Indicadores preditivos estão relacionados com o grau de resposta à(s) terapia(s) administrada(s). Muitos fatores prognósticos também exercem função preditiva das possibilidades terapêuticas mais adequadas àquele tipo de paciente. No final da década de 80 e durante a década de 90, muitos esforços foram empregados na identificação de novos biomarcadores para o câncer de mama, principalmente com a utilização de técnicas de IHQ (LEONG e ZHUANG, 2011). Apesar de muitos estudos terem sido realizados nesta área, atualmente os principais fatores prognósticos e preditivos de resposta à terapia para o câncer de mama continuam sendo os clássicos, como estadiamento, tipo e grau histológico, a expressão de receptores hormonais (ER, PR) e super expressão de ERBB2 (BUITRAGO, UEMURA e FERREIRA SENA, 2011).

O sistema mais utilizado para o estadiamento do câncer em geral é o sistema TNM, que se baseia nos dados de tamanho do tumor primário (T), presença ou ausência de metástases em linfonodos (N) e de metástases à distância (M). Estes parâmetros variam dependendo da localização do tumor (pulmão, mama, cérebro, entre outros) (INCA, 2012).

Dentre os fatores prognósticos clássicos, o tamanho tumoral é bastante relevante (CARTER, ALLEN e HENSON, 1989; LEITNER *et al.*, 1995), sendo necessária a correta avaliação do volume tumoral para o estadiamento das pacientes.

O comprometimento dos linfonodos axilares é o fator prognóstico mais importante no câncer de mama, pois prediz a sobrevida livre de doença (DFS) e a sobrevida global (OS) da paciente (ROSEN *et al.*, 1993; SLOANE, 1994; LEITNER *et al.*, 1995; CADY, 1997). De 20% a 30% das pacientes sem metástases nos linfonodos axilares irá desenvolver recidiva no prazo de 10 anos, em comparação com cerca de 70% das pacientes com envolvimento ganglionar axilar. Fatores como o número absoluto de linfonodos envolvidos e presença de macrometástases (> 0,2 cm) também são dados importantes (FISHER *et al.*, 1993; VERONESI *et al.*, 1993).

A doença metastática é responsável pela maior parte das mortes por câncer de mama. Algumas pacientes já apresentam metástases no momento do diagnóstico, sendo a doença geralmente incurável nestes casos. Outras pacientes desenvolvem metástases em órgãos distantes no decorrer do tratamento (REDIG e MCALLISTER, 2013). Cerca de 30% das mulheres diagnosticadas em estágio inicial do câncer de mama irá desenvolver lesões metastáticas meses ou anos após o diagnóstico (O'SHAUGHNESSY, 2005).

O Sistema de Classificação de Nottingham é o sistema de graduação tumoral recomendado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e outras instituições de relevância internacional (BUIRAGO, UEMURA e FERREIRA SENA, 2011). O índice prognóstico utiliza os fatores de comprometimento axilar, tamanho do tumor e grau histológico. A avaliação do grau histológico segue a classificação de Scarff-Bloom e Richardson, que quantifica a atipia nuclear e porcentagem de formação tubular/glandular encontradas por campos de grande aumento, definindo assim graus I, II e III. Estudos como o de Henson *et al.* (1991) demonstraram que pacientes com grau histológico I e tumor menor que dois (2,0) cm apresentavam excelente prognóstico (99% de sobrevida em cinco anos). O grau histológico mostrou-se um fator prognóstico de relevância, seja independente ou em combinação com o estado linfonodal e tamanho tumoral (GALEA *et al.*, 1992).

O subtipo histológico é um fator importante, uma vez que variações histológicas acarretam diferentes comportamentos biológicos e agressividade tumoral. Pacientes com carcinoma ductal invasor (IDC) tendem a apresentar maior envolvimento linfonodal e pior prognóstico do que pacientes com outros tipos de carcinoma invasor (ADAIR *et al.*, 1974; KETTERHAGEN, QUAKENBUSH e HAUSHALTER, 1984). Em relação ao carcinoma lobular invasor (ILC), aqueles com padrão de disseminação pagetóide e núcleos de baixa densidade estão associados a um melhor prognóstico do que outros subtipos de ILC. Outros subtipos histológicos de carcinomas mamários de prognóstico favorável são o carcinoma tubular (ITC) combinado com histologia de baixo grau, carcinoma mucinoso (MC) puro (DIAB *et al.*, 1999) e carcinoma medular (IMC), uma variante rara de câncer de mama invasivo (cerca de 0,5% dos casos) associada a um melhor prognóstico, particularmente para pacientes com linfonodos negativos. Já o subtipo inflamatório é uma forma rara e agressiva, que representa 2,5% do total de casos de carcinomas mamários (BUIRAGO, UEMURA e FERREIRA SENA, 2011).

A expressão de ER é um importante marcador em câncer de mama, pois fornece o nível de sensibilidade das pacientes ao tratamento endócrino (tamoxifeno, inibidores de aromatase). Existem dois tipos de receptores, codificados por genes diferentes, ER α e ER β , entretanto o receptor ER α é o único que apresenta utilidade clínica. O ligante primário dos ERs é o hormônio 17- β -estradiol, e tumores ER-positivos usam este hormônio como seu principal estímulo de crescimento (LEONG e ZHUANG, 2011). O tratamento adjuvante com tamoxifeno, que faz o bloqueio do receptor, reduz a taxa anual de morte por câncer de mama em 31% nos casos de doença ER-positiva (BUIRAGO, UEMURA e FERREIRA SENA, 2011). Alguns estudos a partir da década de 70, sugeriram uma correlação direta entre os níveis de expressão de ER e a resposta à terapia endócrina (BYAR, SEARS e MC GUIRE, 1979). Já a expressão de PR é fortemente dependente da presença de ER. Tumores que expressam PR mas não expressam ER representam apenas 1% dos casos de câncer de mama (VIALE *et al.*, 2007). Nos raros casos de expressão exclusiva de PR, foram descritos alguns benefícios limitados com o uso de tamoxifeno. Os inibidores de aromatase inibem a conversão das moléculas precursoras para estradiol, e são tratamentos endócrinos adjuvantes alternativos (LEONG e ZHUANG, 2011).

A expressão de ERBB2 é associada à maior agressividade do tumor e à resistência a alguns tipos de tratamento (TOIKKANEN *et al.*, 1992; FERRERO-POUS *et al.*, 2000). A sinalização a partir deste receptor estimula células tumorais a se desenvolverem e se multiplicarem mais rapidamente (DI FIORE *et al.*, 1987; SLAMON *et al.*, 1987). ERBB2 é amplificado em 15% a 25% dos casos de câncer de mama (COUSSENS *et al.*, 1985; SLAMON *et al.*, 1987; KONECNY *et al.*, 2003), e a sua amplificação ou super expressão são reconhecidos como importantes marcadores de agressividade da doença, e são os alvos moleculares para terapias específicas, como com trastuzumabe e lapatinibe (PICCART-GEBHART *et al.*, 2005). A expressão protéica de ERBB2 é avaliada por IHQ, através do uso de anticorpos que reconhecem o domínio extracelular do receptor; já a amplificação do gene é avaliada pela técnica de hibridização *in situ* por fluorescência (FISH). Inicialmente é feita a análise por IHQ, sendo possíveis os seguintes resultados (FIGURA 01): *score* 0 (ausência de marcação da membrana citoplasmática ou marcação <10% das células neoplásicas), *score* 1+ (marcação incompleta e de intensidade discreta em >10% das células neoplásicas), *score* 2+ (marcação de

intensidade ligeira a moderada, de toda a membrana em >10% das células neoplásicas), score 3+ (marcação intensa de toda a membrana em >10% das células neoplásicas). Os casos com score 0 e 1+ são considerados negativos. Os casos 3+ são considerados positivos, e as pacientes são elegíveis para terapia adjuvante com trastuzumabe. Os casos 2+ necessitam de avaliação subsequente por FISH, que determinará se são positivas (com amplificação do gene) ou negativas (sem amplificação do gene) (SAUDADE, TOMÁS e FONSECA, 2005).

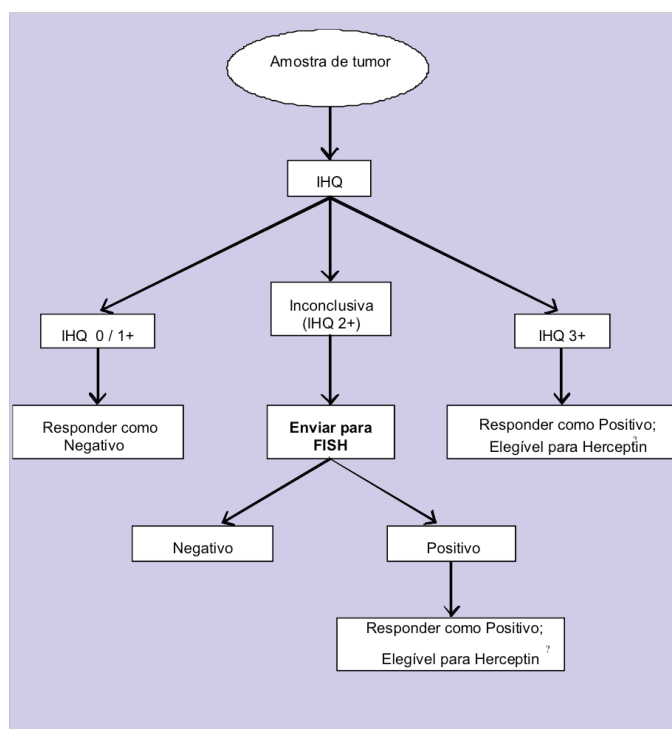


FIGURA 01 – ALGORÍTMO DE AVALIAÇÃO DO GENE ERBB2
FONTE: Saudade, Tomás e Fonseca, 2005

A proteína nuclear Ki-67 é um marcador de proliferação celular, podendo ser detectada por IHQ nas fases G1, S, G2 e M do ciclo celular, e ausente na fase G0 (CONNOR *et al.*, 1997). Este marcador é capaz de estratificar pacientes como de bom ou mal prognósticos (BROWN *et al.*, 1996; MOLINO *et al.*, 1997). Ki-67 é facilmente avaliado e reprodutível, e pode ser uma alternativa ou complemento à avaliação do grau histológico como marcador prognóstico e para a seleção do tratamento adjuvante (MARIE *et al.*, 2010).

Com o surgimento de tecnologias de análise de genomas (baseadas nos microarranjos de DNA), milhares de genes puderam ser analisados concomitantemente, e assim foi possível classificar os tumores de mama de acordo

com o seu perfil gênico intrínseco (PEROU *et al.*, 2000).

2.2 SUBTIPOS INTRÍNSECOS DO CÂNCER DE MAMA

Os perfis de expressão gênica, inicialmente descritos por Perou *et al.* (2000), demonstraram que a heterogeneidade morfológica do câncer de mama pode ser classificada no nível transcricional. Os estudos iniciais (SORLIE *et al.*, 2001; SORLIE *et al.*, 2003) demonstraram que os perfis de expressão gênica mantêm uma variação sistemática que permite a classificação em cinco grupos distintos: *Luminal-A*, *Luminal-B*, *HER2+*, *normal breast-like* e *basal-like*. O grupo *HER2+* apresenta amplificação do gene e expressão aumentada da proteína ERBB2. O grupo *normal breast-like* apresenta o perfil de expressão semelhante ao das células normais, com alta expressão de genes da camada celular basal e baixa expressão de genes da camada celular luminal. O grupo *basal-like* foi previamente reconhecido como um subgrupo com padrão de expressão semelhante ao das células basais. Os perfis de expressão gênica permitiram aos pesquisadores aprofundar o conhecimento acerca da complexidade dos tumores de mama, podendo inclusive fornecer informações sobre o prognóstico das pacientes (PARKER *et al.*, 2009).

Os grupos luminais apresentam padrão de expressão similar ao das células epiteliais (presentes na camada interna do ducto mamário) e são ER positivos. O subgrupo Luminal-A apresenta maior expressão de ER e genes regulados pelo estrogênio, e um melhor desenvolvimento clínico quando comparado ao Luminal-B (LOI, 2008). São tumores bem diferenciados, com baixa atividade proliferativa. Portadoras de tumores Luminal-A são as que apresentam maior sobrevida, embora sejam menos sensíveis à quimioterapia (ROUZIER *et al.*, 2005). No geral estas pacientes recebem apenas tratamento hormonal, e a quimioterapia é justificada apenas em pacientes com metástases em mais de três linfonodos (HARRIS *et al.*, 2007; BURSTEIN *et al.*, 2010; OLSZEWSKI, CHMIELIK e RYS, 2011).

Os tumores do tipo Luminal-B apresentam expressão de receptores de esteróides, com maior capacidade proliferativa em relação aos tumores Luminal-A. Também podem expressar o oncogene *ERBB2*. São recomendadas a terapia hormonal, quimioterapia e, nos casos com amplificação de, tratamento com

trastuzumabe (HARRIS *et al.*, 2007; BURSTEIN *et al.*, 2010; OLSZEWSKI, CHMIELIK e RYS, 2011).

Os tumores do tipo *HER2+* compreendem cerca de 15% de todos os carcinomas de mama, com super-expressão ou amplificação do oncogene *ERBB2*, e ausência da expressão de receptores de esteróides (ER e PR). Geralmente são pouco diferenciados, com presença de metástases em linfonodos. O prognóstico não é favorável. É recomendado o tratamento com trastuzumabe e quimioterapia baseada em antraciclinas (HARRIS *et al.*, 2007; OLSZEWSKI, CHMIELIK e RYS, 2011).

Os tumores do tipo basal compreender de 10 a 20% dos carcinomas de mama. São caracterizados pela coloração positiva das células mioepiteliais da camada basal, presença de citoqueratinas 5/6 e 17 e ausência de positividade dos receptores ER, PR e *ERBB2* (LOI, 2008). As células apresentam alta atividade proliferativa, com formação de metástases frequentes (principalmente para o cérebro e pulmões) (3,7). Perou *et al.* (2000) mostraram que os tumores basais compartilham algumas características moleculares com as células mioepiteliais, e os tumores luminais compartilham características moleculares com as células luminais. Nos tumores basais foram descritas mutações tanto no gene *BRCA1* quanto no gene *TP53* (SORLIE *et al.*, 2001, SORLIE *et al.*, 2003). Apresentam boa resposta à quimioterapia, porém como o risco de recorrência é alto, o prognóstico é desfavorável (HARRIS *et al.*, 2007; OLSZEWSKI, CHMIELIK e RYS, 2011). O termo “triplo negativo” (TNBC) se refere aos tumores que não expressam os receptores ER, PR e *ERBB2* (CLEATOR, HELLER e COOMBES, 2007; DIAZ *et al.*, 2007). Apesar da maioria dos tumores TNBC apresentarem o padrão de expressão gênica semelhante ao subtipo basal, não existe uma superposição completa entre os dois grupos. Os tumores TNBC representam entre 10% a 17% de todos os carcinomas mamários, dependendo do método utilizado para definir a positividade dos receptores em questão (IHQ ou FISH) (KANG, MARTEL e HARRIS, 2008; REIS-FILHO e TUTT, 2008).

Mais recentemente, novos subtipos baseados nos perfis de expressão gênica foram descritos. Os carcinomas apócrinos são considerados biológica e clinicopatologicamente um subtipo especial de câncer de mama (MASUDA, 2012). Farmer *et al.* (2005a) propuseram que o subtipo Apócrino Molecular (*molecular apocrine*) é um grupo específico de câncer de mama com aumento na sinalização

androgênica. O subtipo rico em interferon (*interferon-rich subtype*) foi identificado em 2006 por Hu e colaboradores, e é caracterizado pela alta expressão de genes regulados pelo interferon, como STAT1 (fator de transcrição), e com um melhor prognóstico em relação aos carcinomas basais. Posteriormente, Herschkowitz *et al.* (2007) identificaram um novo grupo de tumores, chamado *claudin-low*, baseado no fato que estes tumores apresentam baixa expressão dos genes claudinas, incluindo as claudinas 3, 4 e 7. O grupo *claudin-low* é considerado um subtipo dos tumores triplo negativos. As proteínas claudinas estão envolvidas nas junções comunicantes entre duas células, juntamente com as E-caderinas. Este grupo de tumores tem como característica a perda das proteínas de junção, apresentando padrões comportamentais de células-tronco e de transição epitelial-mesenquimal (EMT) (PEROU, 2011).

No QUADRO 01 estão representadas as principais características moleculares, histológicas e clínicas de cada um dos grupos (com exceção dos grupos *molecular apocrine* e *interferon-rich*). Estes subtipos identificados através dos perfis de expressão gênica são reconhecidos como os subtipos intrínsecos do câncer de mama.

Subtipo Molecular	Frequência (%)	ER/PR/ERBB2	CK5/6 EGFR	Genes de Proliferação	Genes Característicos	Grau Histológico	Mutações em TP53	Prognóstico
<i>Basal</i>	10-20	ER-/PR-/ERBB2-	+	Super-expressos	<i>KRT5, CDH3, FABP7, KRT17, TRIM29, LAMC2</i>	Alto	Frequentes	Ruim
<i>ERBB2+</i>	10-15	ER-/PR-/ERBB2+	+/-	Super-expressos	<i>ERBB2, GRB7</i>	Alto	Frequentes	Ruim
<i>Normal-like</i>	5-10	ER-/PR-/ERBB2-	+	Pouco expressos	<i>PTN, CD36, FABP4, AQP7, ITGA7</i>	Baixo	Poucas	Intermediário
<i>Luminal-A</i>	50-60	ER+/PR+/ERBB2-	-	Pouco expressos	<i>ESR1, GATA3, KRT8, KRT18, XBP1, FOXA1, TFF3, CCND1, LIV1</i>	Baixo	Poucas	Excelente
<i>Luminal-B</i>	10-20	ER+/- PR+/- ERBB2-/+	-	Super-expressos	<i>ESR1, GATA3, KRT8, KRT18, XBP1, FOXA1, TFF3, SQLE, LAPTM4B</i>	Intermediário /Alto	Intermediário	Intermediário/Ruim
<i>Claudin-low</i>	12-14	ER-/PR-/ERBB2-	+/-	Super-expressos	<i>CD44, SNAI3</i>	Alto	Frequentes	Ruim

QUADRO 01 – CARACTERÍSTICAS DOS SUBTIPOS MOLECULARES DO CÂNCER DE MAMA.

FONTE: O autor (2013), adaptado de Eroles *et al.*, 2012.

LEGENDA: ER, receptor de estrogênio; PR, receptor de progesterona; CK5/6, citoqueratinas 5 e 6; EGFR, *epidermal growth factor receptor gene*; TP53, *tumor protein p53 gene*; +, positivo; -, negativo.

Do ponto de vista biológico, os subtipos intrínsecos do câncer de mama podem refletir as diferentes fases do desenvolvimento das células epiteliais

(FIGURA 02). O grupo *claudin-low* representa os tumores mais primitivos, similares às células-tronco mamárias. O próximo passo na via é o do progenitor luminal, semelhante ao fenótipo do grupo basal. Uma mutação em *BRCA1* está associada ao progenitor luminal/fenótipo basal e, portanto, a perda de *BRCA1* pode bloquear a diferenciação posterior e manter as células nessa etapa de desenvolvimento. O passo seguinte pode levar o progenitor luminal/fenótipo basal ao subtipo *HER2+*, ocorrendo a perda de características basais e ganho de características luminais. Os grupos mais diferenciados são os tumores luminais (A e B) (PRAT e PEROU, 2009).

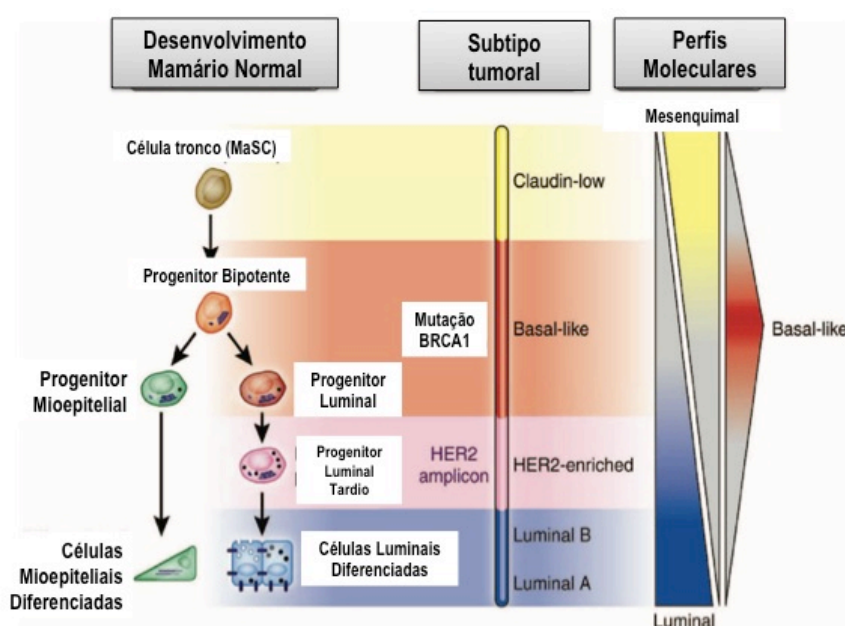


FIGURA 02 – DESENVOLVIMENTO DO EPITÉLIO MAMÁRIO E SUA RELAÇÃO COM OS SUBTIPOS INTRÍNSECOS DO CÂNCER DE MAMA.

FONTE: Prat e Perou, 2009.

NOTA: Esquema comparativo das fases do desenvolvimento mamário normal (células-tronco, MaSC; progenitor bipotente, progenitor mioepitelial, progenitor luminal, progenitor luminal tardio, células mioepiteliais diferenciadas, células luminais diferenciadas) com os subtipos intrínsecos do câncer de mama (*claudin-low*, *basal*, *HER2+*, *luminal-A* e *luminal-B*) e as assinaturas gênicas (mesenquimal, basal e luminal).

A utilização generalizada destes perfis de expressão por microarranjos de DNA na rotina clínica é limitada pelo seu alto custo. Conforme o consenso de St. Gallen de 2012, uma aproximação desta classificação, baseada em marcadores de IHQ corriqueiramente analisados como ER, PR, ERBB2 e Ki-67, pode ser utilizada como alternativa (CHEANG *et al.*, 2009; GOLDBIRSCH *et al.*, 2011). Mesmo na ausência de informação para o marcador de grau tumoral Ki-67, a análise do grau histológico do tumor pode ser obtida através do perfil de coloração com Hematoxilina

e Eosina. Os subtipos definidos pelo critério clínico-patológico são similares, mas não idênticos, aos subtipos intrínsecos, e representam uma aproximação conveniente (GOLDHIRSCH *et al.*, 2011).

Neste trabalho, foi adotada a classificação dos subtipos intrínsecos dos tumores de mama baseada na análise imunohistoquímica dos marcadores ER, PR e ERBB2, e no grau tumoral. Os dados foram obtidos dos laudos clínico-patológicos das pacientes.

2.3 GENES DE REPARO E O CÂNCER DE MAMA

As alterações genéticas que permitem o surgimento de células neoplásicas ocorrem principalmente em vias de controle do ciclo celular e reparo de DNA. Cópias alteradas dos genes que atuam nestas vias podem levar à progressão maligna pela sua perda de função, sendo portanto, considerados TSGs. Nesse caso, ao contrário dos oncogenes, é necessário que as duas cópias de um TSG sejam alteradas ou inativadas para que ocorra o desenvolvimento tumoral. Acredita-se que vários genes envolvidos nessas vias, muitos deles ainda não identificados, sejam fortes candidatos a marcadores para a origem e progressão tumoral. Além disso, diversas terapias padrão para o tratamento de vários tumores, inclusive os de mama, utilizam drogas que induzem lesões específicas no DNA (por exemplo, ciclofosfamida). Uma vez que essas lesões sejam induzidas, elas não devem ser reparadas, para que se acumulem e levem as células cancerosas à morte (ALTIERI *et al.*, 2008).

Dalhus *et al.* (2009) realizaram uma revisão das vias de reparo que operam em tipos específicos de danos no DNA, sendo que cada via compreende inúmeras moléculas. Estas vias incluem o reparo por excisão de bases (BER), o reparo por excisão de nucleotídeos (NER), o reparo de mal pareamento (MMR) e o reparo de quebras de fita dupla no DNA (DSBs) por recombinação homologa (HR) e por junção terminal não-homologa (NHEJ) (FIGURA 03).

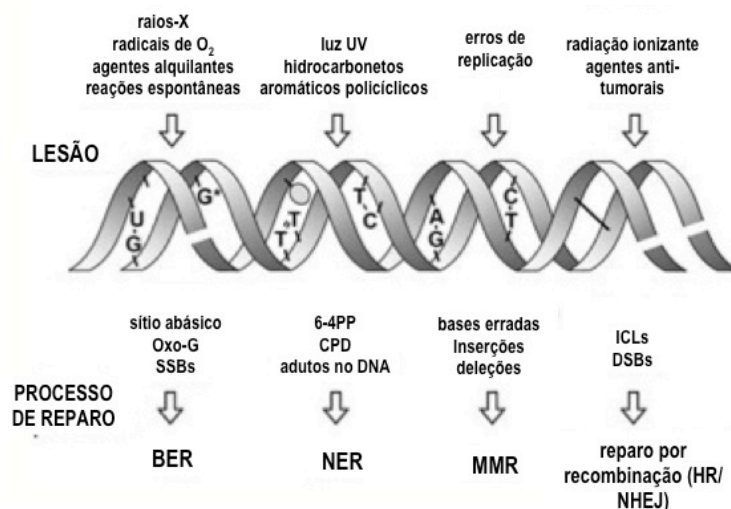


FIGURA 03 – TIPOS DE LESÕES NO DNA, AGENTES CAUSADORES E MECANISMOS DE REPARO.

FONTE: Altieri *et al.*, 2008; adaptado de De Boer e Hoeijmakers (2000).

NOTA: agentes causadores de danos no DNA (raios-X, radicais de oxigênio, agentes alquilantes, reações espontâneas, luz UV, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, erros de replicação, radiação ionizante, agentes anti-tumorais), tipos de lesões que eles introduzem (sítios abásicos, oxo-G, quebras de fita simples, fotoprodutos de pirimidina-(6-4)-pirimidona (6-4PPs), dímeros de pirimidina ciclobutano (CPD), adutos, mal-pareamentos, inserções, deleções, ligações cruzadas, quebras de fita dupla) e mecanismos de reparo (BER, NER, MMR, NHEJ).

A via BER opera em lesões pequenas, como bases oxidadas ou reduzidas, adutos pequenos no DNA e lesões produzidas por agentes metilantes. A base danificada é removida por enzimas DNA glicosilases base-específicas, como a enzima OGG1, que remove a guanina modificada 8-oxoG, causada por espécies reativas de oxigênio. O sítio abásico é restaurado por ação de endonucleases, remoção do resíduo de açúcar, síntese de DNA usando a outra fita como molde e ligação por uma enzima DNA ligase (DALHUS *et al.*, 2009).

A via NER repara lesões como dímeros de pirimidinas, outros fotoprodutos, adutos químicos grandes e ligações cruzadas (*cross-links*). Os principais genes envolvidos nesta via de reparo são os pertencentes à família XP, cujas mutações germinativas podem desencadear a síndrome conhecida como *Xeroderma pigmentosum*. A via NER envolve pelo menos quatro etapas: 1) reconhecimento do dano por um complexo de proteínas de ligação ao DNA; 2) abertura do DNA pelo complexo TFIIH; 3) remoção do fragmento danificado em fita única, geralmente de 27 a 30 pares de bases (pb); e 4) reparo por síntese através da enzima DNA polimerase. Esta via de reparo pode ser categorizada em duas classes: reparo genômico global (GG-NER) e reparo acoplado à transcrição (TC-NER). Ambas

compartilham os mesmos mecanismos de reparo, sendo diferenciadas pelos mecanismos de reconhecimento do dano no DNA (DE BOER e HOEIJMAKERS, 2000; HANAWALT, 2002; PARK e CHOI, 2006).

A via MMR corrige erros de replicação causados pela ação de enzimas DNA polimerases, como mal pareamento de bases, inserções e deleções. Os genes envolvidos nesta via incluem *MLH1*, *MSH2*, *PMS2* e *MSH6* (DALHUS *et al.*, 2009).

2.3.1 Reparo de quebras de fita dupla no DNA (DSBs)

A integridade do genoma está sob constante ameaça de danos no DNA. Mesmo processos internos, como o metabolismo celular normal, geram subprodutos que podem causar lesões. Em algumas situações, o dano é grave o suficiente para gerar uma DSBs. Se estas quebras não forem reparadas, podem ocorrer rearranjos de DNA e instabilidade cromossômica. As células monitoram o DNA por sinais de danos, e a resposta é iniciada por distorções na estrutura do DNA, eventualmente levando à ativação dos pontos de checagem do ciclo celular e das vias de reparo (LITMAN *et al.*, 2008).

DSBs podem ser produzidas por erros de replicação ou pela ação de agentes exógenos, como inibidores de topoisomerases, bleomicina e a radiação ionizante (LITMAN *et al.*, 2008). Existem duas vias de reparo principais para esse tipo de lesão: NHEJ e HR. O estágio do ciclo celular é o principal determinante do mecanismo de reparo escolhido. Células na fase G1 do ciclo celular reparam DSBs principalmente por NHEJ, enquanto NHEJ e HR podem ocorrer durante as fases S e G2 do ciclo celular (GREENBERG, 2008).

O reparo de uma DSB através da via NHEJ promove a ligação direta das duas fitas a partir da quebra, e é propensa a erros, ao contrário do reparo por HR. No reparo por HR, as pontas do DNA quebrado são degradadas na extremidade 5'-OH, permitindo a formação de uma região de DNA simples fita (ssDNA) na extremidade 3'-OH. A protuberância 3'-OH é inicialmente estabilizada pela proteína de ligação a ssDNA, RPA, que é posteriormente trocada pela proteína RAD51. O filamento nucleoprotéico com RAD51 procura por uma região com homologia de sequência, e catalisa a invasão das caudas 3'-OH na dupla hélice da cromátide-irmã

não danificada, permitindo a recombinação. As fitas são estendidas pela enzima DNA polimerase e a recombinação produz duas moléculas de DNA intactas e livres de erros (FIGURA 04). Devido a dependência da fase do ciclo celular destes mecanismos de reparo, a atividade de enzimas quinase dependentes de ciclinas (CDKs) controla o início do reparo por *HR*. Estudos em leveduras mostraram que CDK1 é necessária para a ressecção na extremidade 5'-OH, que vai gerar ssDNA para a associação de RAD51 (IRA *et al.*, 2004).

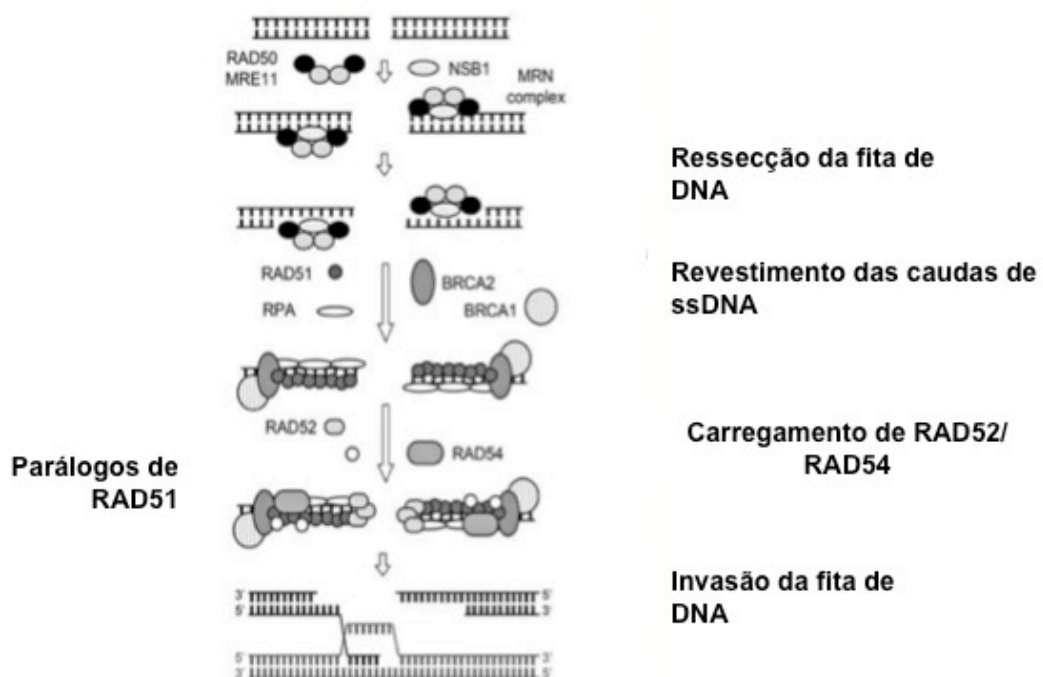


FIGURA 04 – MODELO DE RECOMBINAÇÃO HOMÓLOGA (*HR*).

FONTE: Altieri *et al.*, 2008.

NOTA: Inicialmente ocorre o processamento das DSBs por uma nuclease (complexo MRN) para gerar pontas 3' de DNA simples fita, que serão cobertas pelas proteínas RPA. O recrutamento do complexo para os sítios de DSB é promovido pela ligação de NSB1. Após a ressecção da fita de DNA e a ligação das proteínas RAD51, BRCA1 e BRCA2, o filamento nucleoprotéico resultante invade a sequência complementar da cromátide-irmã, formando um heterodúplex de DNA.

Três importantes proteínas que fazem parte do reparo de DSBs por *HR* são BRCA1, BRCA2 e PALB2.

O gene *BRCA1* está localizado em 17q21, contém 110 kb e 23 éxons. O principal mRNA transcrito (*BRCA1-001*) contém 7094 pb, sendo identificado nos testículos, timo, mamas e ovários, e a proteína codificada contém 1863 resíduos de aminoácidos (*Ensembl*, disponível em: <http://www.ensembl.org/index.html>) e apresenta 190 kDa (JENSEN *et al.*, 1996). Além deste, outros 24 transcritos

codificadores de proteínas são conhecidos (*Ensembl*). Aproximadamente 60% da proteína deriva do éxon 11 do gene, e esta região protéica é extensivamente fosforilada em resposta à radiação ionizante (CORTEZ *et al.*, 1999; LEE *et al.*, 2000; TIBBETTS *et al.*, 2000). Embora a função do gene *BRCA1* já tenha sido associada ao reparo de DNA há mais de uma década, seu papel específico no processo de HR ainda não foi totalmente elucidado. Sabe-se que vários de seus domínios funcionais promovem a recombinação homóloga e são necessários para a supressão tumoral (REID *et al.*, 2008). *BRCA1* também desempenha um papel crítico no controle dos pontos de checagem do ciclo celular e na manutenção da estabilidade genômica, através da formação de complexos distintos pela associação com diferentes proteínas adaptadoras (WANG *et al.*, 2009).

Ao contrário das mutações somáticas raras, a desregulação epigenética do gene *BRCA1* foi observada em 30% dos carcinomas de mama esporádicos (MASTERS *et al.*, 2001). A expressão de *BRCA1* pode modular a resposta à quimioterapia. A diminuição na expressão de *BRCA1* detectada pela metodologia de PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR) em linhagens celulares de câncer de mama, mostrou aumento da sensibilidade das mesmas à cisplatina, mas resistência ao paclitaxel por defeitos na resposta apoptótica, enquanto o efeito oposto foi observado na presença de níveis normais ou elevados do gene (LAFARGE *et al.*, 2001). No câncer de mama esporádico, a ausência ou redução da expressão de *BRCA1* foi associada com o aumento do tamanho tumoral, alto grau histológico, comprometimento de linfonodos axilares, invasão vascular, receptores de estrogênio e progesterona negativos e pior prognóstico (RAKHA *et al.*, 2008).

A proteína *BRCA2* humana apresenta vários domínios de ligação ao DNA e à enzima RAD51 (SUNG, 1994; BAUMANN, BENSON e WEST, 1996), sugerindo que *BRCA2* atue diretamente na promoção da recombinação homóloga mediada por RAD51 (LIU e WEST, 2002). Não há evidências do silenciamento epigenético por hipermetilação no promotor de *BRCA2* em carcinomas de mama (COLLINS *et al.*, 1997), com a metilação ocorrendo apenas raramente em carcinomas de ovário (HILTON *et al.*, 2002). Uma alternativa plausível para o mecanismo de inativação de *BRCA2* envolve a amplificação do gene *EMSY*. *EMSY* interage com o éxon 3 de *BRCA2* e com proteínas que fazem o remodelamento da cromatina, e quando super-expresso, inibe a transcrição de *BRCA2*. Foi sugerido que a amplificação de *EMSY* seja uma via para a inativação de *BRCA2* nos carcinomas esporádicos (HUGHES-

DAVIES *et al.*, 2003).

Xia *et al.* (2006) mostraram que o gene *PALB2* está localizado em 16p12 e apresenta 13 éxons, codificando apenas um transcrito com 4058 pb e uma proteína com 1186 resíduos de aminoácidos e 130 kDa (*Ensembl*). O produto deste gene se colocaliza e forma um complexo com a proteína BRCA2 no núcleo, promovendo sua estabilidade com as estruturas nucleares, e permitindo que ocorra o reparo por recombinação e atuação nos pontos de checagem do ciclo celular. A imunodepleção de BRCA2 remove conjuntamente parte de PALB2, entretanto a imunodepleção de PALB2 remove consigo quase todas as proteínas BRCA2 (XIA *et al.*, 2006). Estudos sugerem fortemente que PALB2 atue como uma molécula de ligação entre BRCA1 e BRCA2 (SY *et al.*, 2009; ZHANG *et al.*, 2009a; ZHANG *et al.*, 2009b) durante o reparo de lesões no DNA (FIGURA 05). A redução da expressão de *PALB2* através do silenciamento por siRNA sensibilizou células *HeLa* à mitomicina C, resultando em um fenótipo típico de Anemia de Fanconi (XIA *et al.*, 2006). Potapova *et al.* (2008) identificaram por RT-qPCR que a expressão de *PALB2* foi 28 vezes menor em tumores primários da mama com hipermetilação no promotor em relação ao tecido não-tumoral pareado da paciente.

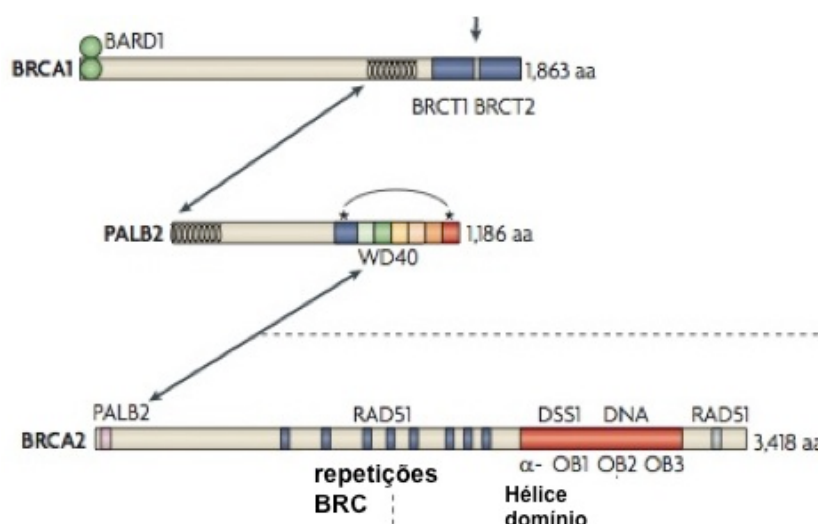


FIGURA 05 – INTERAÇÃO DA PROTEÍNA PALB2 COM BRCA1 E BRCA2.

FONTE: Moinahan e Jasin, 2010.

NOTA: A proteína BRCA1 contém 1863 resíduos de aminoácidos. BRCT1 e BRCT2 são domínios de interação de BRCA1 com BRIP1 e outras proteínas. A proteína PALB2 contém 1186 resíduos de aminoácidos. WD40 são os domínios de ligação de PALB2 a BRCA2. A proteína BRCA2 contém 3418 resíduos de aminoácidos. As repetições BRC na proteína BRCA2 são domínios de ligação a RAD51.

Aproximadamente 10% dos casos de câncer de mama apresentam uma

agregação familiar, e quase metade destes derivam de mutações germinativas nos genes *BRCA1* e *BRCA2* (GREENBERG, 2008). Os outros casos de câncer de mama hereditários ocorrem devido à mutações germinativas nos genes *PALB2*, *TP53*, *PTEN*, *CHEK2*, *ATM*, *NBS1*, *RAD50* e *BRIP1*. Os genes *PALB2* e *BRIP1* respondem por cerca de 2% dos casos de câncer de mama e ovário familiares não relacionados aos genes *BRCA1/2* (BARROSO *et al.*, 2009).

Tumores com mutações no gene *PALB2* apresentam características diferentes daqueles com mutações em *BRCA1*, sendo mais semelhantes a tumores com mutações em *BRCA2* (TISCHKOWITZ *et al.*, 2007). Células com alterações nos genes *BRCA1*, *BRCA2*, *BRIP1* e *PALB2* apresentam defeitos no reparo de DSBs por HR (SCULLY e LIVINGSTON, 2000; CUMMING *et al.*, 2001; VENKITARAMAN *et al.*, 2002; VENKITARAMAN *et al.*, 2004). Uma única mutação em qualquer um destes genes é suficiente para aumentar significativamente o risco de desenvolver câncer de mama.

2.3.2 Via de reparo de DNA da Anemia de Fanconi (FA-BRCA)

A via *FA-BRCA* leva o nome de uma doença recessiva rara, a Anemia de Fanconi, causada por mutações germinativas em genes de reparo do DNA, e foi descrita em 1927 por Guido Fanconi. A doença é caracterizada clinicamente por múltiplas anormalidades congênitas, falência da medula óssea com consequente anemia aplástica, suscetibilidade ao desenvolvimento de cânceres e leucemias (como carcinomas de células escamosas e leucemia mielóide aguda), instabilidade cromossômica e hipersensibilidade celular a agentes que causam ligações cruzadas entre as fitas do DNA (ICLs) (OZAWA *et al.*, 2010). Até o momento foram identificados 15 grupos de complementação da doença: A, B, C, D1, D2, E, F, G, I, J, L, M, N, O, e mais recentemente P (JONES & HUANG, 2012; HAYS, 2013). A doença é causada através da inativação autossômica recessiva ou ligada ao cromossomo X recessiva de um dos 15 genes envolvidos. O QUADRO 02 apresenta os grupos de complementação da Anemia de Fanconi, com as taxas de prevalência na população, posição cromossômica dos genes, tamanho das proteínas e funções das mesmas.

Genes	Frequência (%)	Posição	Peso (kDa)	Função
<i>FANCA</i>	66	16q24.3	163	Monoubiquitinação de FANCD2
<i>FANCB</i>	2	Xp22.31	95	Monoubiquitinação de FANCD2
<i>FANCC</i>	10	9q22.3	63	Monoubiquitinação de FANCD2
<i>FANCD1 (BRCA2)</i>	2	13q13.1	380	Mediador da HR, ativado por FANCD2-I
<i>FANCD2</i>	2	3p25.2	155,162	Ubiquitinado após dano no DNA
<i>FANCE</i>	2	6p21-22	60	Ligação direta a FANCD2, monoubiquitinação
<i>FANCF</i>	2	11p15	42	Monoubiquitinação de FANCD2
<i>FANCG</i>	9	9p13	68	Monoubiquitinação de FANCD2
<i>FANCI</i>	2	15q25-26	140,147	Ubiquitinado após dano no DNA
<i>FANCDJ (BRIP1)</i>	2	17q22-24	140	Helicase, ativado por FANCD2-I
<i>FANCL</i>	0,2	2p16.1	43	Monoubiquitinação de FANCD2
<i>FANCM</i>	0,2	14q21.2	250	Helicase, localiza o complexo principal ao DNA
<i>FANCN (PALB2)</i>	2	16p12.1	140	Interage com FANCDI, ativado por FANCD2-I
<i>FANCO (RAD51C)</i>	-	17q21-q24	-	Interage com FANCDI, ativado por FANCD2-I
<i>FANCP (SLX4)</i>	-	-	-	Interage com FANCDI, ativado por FANCD2-I

QUADRO 02 – GRUPOS DE COMPLEMENTAÇÃO DA ANEMIA DE FANCONI.

FONTE: O autor (2013), adaptado de Moldovan e D'Andrea, 2009.

NOTA: genes que causam os 15 grupos de complementação da Anemia de Fanconi, prevalência das mutações na população em cada um dos genes, posição cromossômica, tamanho das proteínas codificadas e atividades desempenhadas na via *FA-BRCA*.

A via da Anemia de Fanconi é composta por genes cujos produtos atuam na HR, mais especificamente no reparo de ICLs, que podem provocar a parada da forquilha de replicação e transcrição. Esse tipo de lesão é provocado por agentes como cisplatina e diepoxibutano (DEB) (TANIGUCHI e D'ANDREA, 2006), muitas vezes usados como agentes quimioterápicos. Acredita-se que uma das funções da via *FA-BRCA* seja a proteção de segmentos livres de DNA gerados durante o reparo de ICLs. O processamento incorreto destes segmentos de DNA pode levar a deleções e aberrações cromossômicas (MIRCHANDANI e D'ANDREA, 2006).

Oito proteínas da via, FANCA, B, C, E, F, G, L e M; formam um complexo com atividade de monoubiquitina ligase. Este complexo é necessário para a monoubiquitinização de FANCD2 e FANCI em resposta a lesões no DNA durante a replicação (SOULIER *et al.*, 2005) (FIGURA 06). A ubiquitinação de FANCD2 é necessária para o processo de reparo de ICLs, enquanto a ubiquitinação de FANCI providencia um mecanismo regulador da via, acentuando a capacidade de reparo (HUSSAIN *et al.*, 2004). Estas duas proteínas posteriormente vão se localizar nos focos de reparo do DNA, juntamente com as proteínas efetoras FANCN (PALB2), J (BRIP1), O (RAD51C), D1 (BRCA2) e P (SLX4) (JONES & HUANG, 2012).

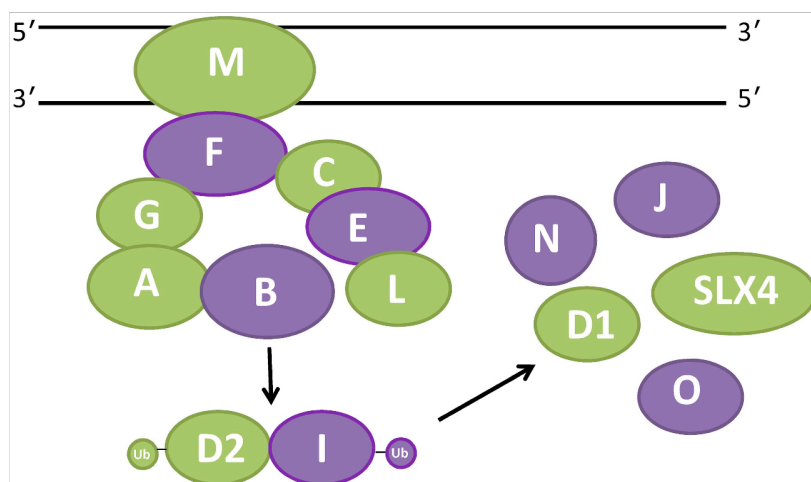


FIGURA 06 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO COMPLEXO PROTÉICO DA VIA *FA-BRCA*.

FONTE: Hays, 2013.

NOTA: As proteínas FANCA-A, B, C, E, F, G, L e M formam o complexo principal, que promove a mono-ubiquitinação do complexo FANCD2-I. Este complexo medeia o reparo de ICLs em conjunto com FANCD1, J, N, O e SLX4.

O gene *FANCA* está localizado em 16q24.3 (PRONK *et al.*, 1995) e origina cinco transcritos diferentes, todos codificantes. O maior deles contém 5460 pb, apresenta 43 éxons e codifica um polipeptídeo de 1455 resíduos de aminoácidos (LO TEN FOE *et al.*, 1996; *Ensembl*). Van Wezel *et al.* (2005) analisaram a expressão por RT-qPCR de *FANCA* e outros genes de 16q em um painel de linhagens de carcinomas mamários e tumores primários da mama com o *status* de perda de heterozigose (LOH) previamente definido. Não foram observadas diferenças significativas na expressão dos genes em relação ao *status* de LOH, mas a expressão de *FANCA* apresentou aumento diretamente proporcional em relação ao grau tumoral.

Strathdee *et al.* (1992) mapearam o gene *FANCC* em 9q22.3 através de hibridização *in situ*. Ele apresenta 10 transcritos diferentes, identificados em diversos tecidos e linhagens celulares, sendo que três são codificantes. O maior transcrito contém 4585 pb, 15 éxons e codifica uma proteína com 558 resíduos de aminoácidos (*Ensembl*) e 60 kDa (YAMASHITA *et al.*, 1994). Embora os níveis de mRNA de *FANCC* sejam detectados através de todo o ciclo celular, os menores níveis são observados nas fases G1/S, e os maiores na fase M (HEINRICH *et al.*, 2000).

O gene *FANCD2* está mapeado em 3p25.3, apresenta 5102 pb, contém 44 éxons e codifica uma proteína nuclear com 1451 resíduos de aminoácidos

(FANCD2-002) (TIMMERS *et al.*, 2001). Treze transcritos diferentes são conhecidos, sendo que quatro codificam proteínas (*Ensembl*). Garcia-Higuera *et al.* (2001) demonstraram que na forma ativada, a proteína se colocaliza com BRCA1 nos sítios de danos no DNA. Van Der Groep *et al.* (2008) observaram ausência da expressão de *FANCD2* em 10% a 20% dos tumores de mama esporádicos e associados a mutações em *BRCA1*. Além disso, a alta expressão do gene foi um fator de mau prognóstico isolado na análise de sobrevivência. Zhang *et al.* (2010) analisaram a expressão de *FANCD2* em 162 mulheres chinesas com carcinomas mamários esporádicos invasivos, e em 13% dos casos a expressão do gene foi negativa, e apresentou uma associação inversa com o grau histológico e o estágio tumoral.

De Winter *et al.* (2000) determinaram a localização do gene *FANCF* em 11p15. Ele não apresenta íntrons, contém 3309 pb de tamanho e codifica uma proteína com 374 resíduos de aminoácidos (*Ensembl*), encontrada predominantemente no núcleo. Narayan *et al.* (2004) examinaram os níveis de expressão de *FANCA*, *C*, *E*, *F* e *G* em nove linhagens de carcinomas cervicais, e apenas *FANCF* apresentou expressão reduzida em relação ao tecido cervical não-tumoral, em linhagens com e sem hipermetilação no promotor do gene. Wang *et al.* (2006) avaliaram sete linhagens de carcinomas de ovário e 18 espécimes de tumores de ovário, e observaram a diminuição na expressão do mRNA e da proteína *FANCF* quando comparado com tecido não-tumoral de ovário.

O vínculo genético entre *BRCA* e *FA* foi identificado pela descoberta que o gene *BRCA2* correspondia ao gene *FANCD1*, previamente identificado como um dos genes envolvidos na Anemia de Fanconi por análises de complementação (grupo de complementação D1) e que a herança de duas cópias mutadas de *BRCA2* causava a doença (HOWLETT *et al.*, 2002). Mutações no gene *BRCA1* não foram associadas com nenhum grupo de complementação da doença, já a proteína que interage diretamente com a BRCA1, BRIP1 ou FANCI, foi identificada como a responsável pelo grupo de complementação J (LITMAN *et al.*, 2005; LEVITUS *et al.*, 2005; LEVRAN *et al.*, 2005). A ligação funcional entre *BRCA* e *FA* foi estabelecida com a descoberta de que as proteínas das vias são mutuamente dependentes umas das outras para sua localização nas estruturas nucleares (LITMAN *et al.*, 2008).

Em adição ao reparo clássico de ICLs, a via *FA-BRCA* também atua no reparo de outros danos no DNA. Por exemplo, a luz ultravioleta (UV) pode ativar a via, evidenciado pela monoubiquitinação da proteína FANCD2 (DUNN *et al.*, 2006),

principalmente se ocorreram falhas no reparo por NER ou de síntese translesão. A via *FA-BRCA* também responde a agentes alquilantes do DNA, como temozolomida (TMZ), 1,3-bis[2-cloroetil]-1-nitroso-ureia (BCNU) e ciclofosfamida, compostos que são frequentemente utilizados como quimioterápicos no tratamento de gliomas malignos (CHEN, TANIGUCHI e D'ANDREA, 2007). TMZ e BCNU também ativam a via pela monoubiquitinação de FANCD2.

Barroso *et al.* (2006) estudaram a relação entre o câncer de mama e os genes *FANCA*, *FANCL* e *FANCD2*, e encontraram uma associação positiva significativa entre o SNP rs2272125 (L1366L) no gene *FANCD2* e a ocorrência deste tipo de tumor. Em um estudo posterior (BARROSO *et al.*, 2009), encontraram novas associações com os genes *FANCC*, *I*, *J*, *N*, *ATM* e *BRCA2*. Em relação ao gene *FANCF*, Wang *et al.* (2006) encontraram redução da expressão em carcinomas de ovário, em parte devido à metilação no promotor, observada em 27,8% dos tumores e 14,3% das linhagens celulares analisadas. O tratamento das linhagens com o agente desmetilante 5-Aza-2'-deoxicitidina (AZA) reativou a transcrição e a tradução de *FANCF*, com subsequente redução da proliferação das células tumorais *in vitro* e *in vivo*.

Em muitos tumores esporádicos foi observada a inativação da via *FA-BRCA*, principalmente por LOH e metilação no promotor dos genes (TANIGUCHI e D'ANDREA, 2006). Ainda não são claras as vantagens que a inativação desta via trazem para as células transformadas, entretanto este defeito no reparo do DNA pode ser usado como estratégia terapêutica. Em células com inativação de genes de uma via de reparo do DNA, a inativação de uma segunda via, por exemplo, com o uso de siRNA, poderia ser letal para estas células (MOLDOVAN e D'ANDREA, 2009), fenômeno caracterizado por letalidade sintética. Em um estudo de *knockdown* por siRNA, a via *FANCD-BRCA* apresentou letalidade sintética com a via da Ataxia Telangiectasia (*ATM*) (KENNEDY *et al.*, 2005). Portanto, inibidores de ATM podem ser usados como potentes agentes anti-tumorais para tratar pacientes com inativações específicas de genes da via *FA-BRCA*. Em uma estratégia semelhante usam-se inibidores da enzima Poli-(ADP)-Polimerase (PARP) (enzima de síntese de DNA translesão) em pacientes com câncer de mama e ovário deficientes para o reparo de danos no DNA por HR (BRYANT *et al.*, 2005; FARMER *et al.*, 2005b).

2.4 TERAPIAS SISTÊMICAS ADJUVANTES NO CÂNCER DE MAMA

O objetivo da terapia sistêmica adjuvante é o aumento da DFS e da OS, associado ao tratamento local (cirurgia e/ou radioterapia). A quimioterapia adjuvante emergiu como um instrumento para erradicar metástases locais ou à distância, que surgem principalmente pela presença de micrometástases, dificilmente diagnosticadas (HERNANDEZ-AYA e GONZALEZ-ANGULO, 2013). No ano 2000, os Institutos Nacionais de Saúde dos EUA (*National Institutes of Health*, NIH) recomendaram considerar a terapia sistêmica adjuvante para pacientes com tumores de mama com 1,0 cm ou mais (EIFEL *et al.*, 2001). Dados do último “*Early Breast Cancer Clinical Trialists’ Collaborative Group*” (EBCTCG, 2012) mostraram que a redução de risco proporcionada pela quimioterapia é pouco influenciada pela idade, comprometimento de linfonodos, diâmetro tumoral ou diferenciação, ER e uso de tamoxifeno; e que poucos marcadores de expressão gênica (RT-qPCR) ou protéica (IHC) disponíveis atualmente podem auxiliar na predição do risco de recorrência e quimiosensibilidade. A decisão do uso ou não da terapia sistêmica adjuvante é baseada na análise dos fatores prognósticos (ver tópico 2.1) que predizem recorrência e a eficácia do tratamento, balanceado aos efeitos tóxicos dos fármacos (HERNANDEZ-AYA & GONZALEZ-ANGULO, 2013).

O QUADRO 03 apresenta os principais esquemas quimioterápicos utilizados na adjuvância do câncer de mama atualmente.

Esquemas	
CMF	6 ciclos de C 100 x 14 + M 40 x 2 + 5-FU x 2, a cada 28 dias
AC	4 ciclos de A 60 + C 600, IV a cada 21 dias
EC	4 ciclos de E 90 + C 600, IV a cada 21 dias
FAC	6 ciclos de 5-FU 500 x 2 + A 50 x 1 + C 500 IV x 1, a cada 3 semanas
FEC	6 ciclos de 5-FU 500 x 2 + E 60 x 2 + C 500 IV x 1, a cada 4 semanas
AC → P	4 ciclos de A 60 C 600, a cada 3 semanas → 12 ciclos de P 80, semanal
AC → D	4 ciclos de A 60 C 600, a cada 3 semanas → 4 ciclos de D 100, a cada 3 semanas
FEC → D	3 ciclos de F 500 E 100 C 500, a cada 3 semanas → 3 ciclos de D 100, a cada 3 semanas
FEC → P	3 ciclos de F 600 E 90 C 600, a cada 3 semanas → 8 ciclos de P 100, semanal

QUADRO 03 – ESQUEMAS TERAPÊUTICOS UTILIZADOS NO TRATAMENTO ADJUVANTE DO CÂNCER DE MAMA.

FONTE: O autor (2013), adaptado de Hernandez-Aya e Gonzalez-Angulo, 2013.

NOTA: os dados estão apresentados em mg/m² x frequência por ciclo: x 14= dias 1 a 14, oral; x 2= dias 1 a 8 IV; x 1 dia 1 IV.

LEGENDA: C, ciclofosfamida; M, metotrexato; F, 5'-fluorouracil (5-FU); A, doxorubicina; E, epirubicina; P, paclitaxel; D, docetaxel; IV, intravenoso.

Os agentes alquilantes, como a ciclofosfamida e cisplatina, são compostos eletrofílicos reativos direta ou indiretamente (dependem da ativação através de uma via de reparo do DNA), que se associam covalentemente às bases nitrogenadas, formando adutos no DNA. A ciclofosfamida é um dos compostos mais comumente prescritos no tratamento quimioterápico de tumores sólidos e hematológicos em adultos e crianças, particularmente em combinação com antraciclinas e esteróides. A cisplatina também é comumente prescrita no tratamento de tumores sólidos, e a resistência a este tipo de fármaco é um problema clínico relevante atualmente (HELLEDAY *et al.*, 2008).

Os antimetabólitos, como 5-FU (análogo de pirimidinas) e metotrexato (MTX, análogo do ácido fólico), são moléculas que se assemelham aos nucleotídeos, seus precursores ou cofatores necessários à biossíntese dos mesmos. Atuam inibindo as vias metabólicas dos nucleotídeos trifosfatados (dNTPs), ou seja, através da depleção de nucleotídeos nas células (HELLEDAY *et al.*, 2008).

As antraciclinas são antibióticos antitumorais, como a doxorrubicina e epirrubicina. Seus mecanismos de ação ocorrem através da intercalação ao DNA e ligação com grupos fosfolipídicos (carregados negativamente) da membrana celular, alterando o transporte de íons; formando radicais livres do oxigênio e através de ligações inter-filamentares com o DNA, levando ao bloqueio da síntese do DNA e RNA e diminuindo a atividade da topoisomerase II (ALMEIDA *et al.*, 2005). Em conjunto com os taxóis, são as drogas citotóxicas mais ativas para o tratamento do câncer de mama (ALVAREZ, 2010).

Os taxóis, como o paclitaxel, são alcalóides vegetais extraídos das cascas do tronco de árvores do teixo (*Taxus brevifolia Nutt*). Atuam como agentes antimitóticos, interferindo na formação de microtúbulos. O taxotere, ou docetaxel, é um derivado sintético do taxol (CORRÊA, 1995).

2.5 O GENE *MTAP*

O gene *MTAP* codifica a enzima metiltioadenosina fosforilase, está localizado em 9p21.3, próximo aos genes *miR-31* e *CDKN2A* (BERTINO *et al.*,

2011). Este último está distante aproximadamente 100 kb (HUSTINX *et al.*, 2005) e codifica o inibidor de quinase dependente da ciclina p16^{INK4A} (RUAS e PETERS, 1998; SHARPLESS, 2005; KRIMPENFORT *et al.*, 2007). *MTAP* é expresso em todos os tecidos normais, mas é frequentemente deletado em tumores, principalmente em co-deleção com o gene *CDKN2A*. Nas células normais, a proteína MTAP atua na via de biossíntese de purinas, sendo importante para o resgate de adenina e metionina (KIM *et al.*, 2011), clivando o substrato 5'-deoxy-5'-methylthioadenosine (MTA) gerado durante a biossíntese de poliaminas, e produzindo adenina e 5-methylthioribose-1-phosphate (MTR-1-P), que é posteriormente convertido em metionina. Esta via é a única fonte conhecida de adenina celular livre. Células que perderam o gene *MTAP* não são capazes de resgatar adenina e metionina, e são mais sensíveis às substâncias que inibem a síntese *de novo* de purinas ou à ausência de metionina, do que as células normais (CHEN *et al.*, 1997) (FIGURA 07).

Recentemente, Curtis e colegas (2012) observaram uma alta frequência de deleções no gene *MTAP* em uma análise integrada de variação de número de cópias (CNV) do DNA e expressão gênica, em quase dois mil tumores primários da mama. Entretanto, informações sobre a deficiência de *MTAP* em tumores mamários são ainda limitadas, embora já tenha sido descrita a inativação deste gene nas linhagens celulares de câncer de mama MCF-7 e MDA-MB-231 (BERTINO *et al.*, 2011). Em estudo anterior do nosso grupo de pesquisa (DE OLIVEIRA *et al.*, 2010) descrevemos uma alta frequência desta codeleção (90%) por análise de LOH em tumores de mama esporádicos, utilizando marcadores microssatélites intragênicos a *MTAP* e *CDKN2A*.

A descoberta de que a enzima MTAP está geralmente ausente em tumores levou à proposição de terapias seletivas, que utilizam a deficiência do gene para selecionar especificamente células tumorais MTAP-negativas (KADARIYA *et al.*, 2011). Neste contexto, a análise da expressão do gene em carcinomas mamários de diferentes subtipos poderá contribuir para o desenvolvimento e emprego de novas estratégias terapêuticas. Uma terapia promissora foi proposta por Lubin e Lubin (2009), baseada na adição do substrato da enzima, MTA, no tratamento de tumores MTAP-negativos com análogos tóxicos de purinas e pirimidinas, como 6-tioguanina (6-TG) e 5-FU, respectivamente. Nas células normais, a adenina produzida a partir de MTA compete com os análogos, que por estarem em menor quantidade, não

exercem seus efeitos tóxicos no organismo. Entretanto, as células tumorais MTAP-negativas não são capazes de sintetizar adenina a partir do substrato, sendo que nessas células os análogos de purinas e pirimidinas são metabolizados e exercem seus efeitos tóxicos (TANG *et al.*, 2000).

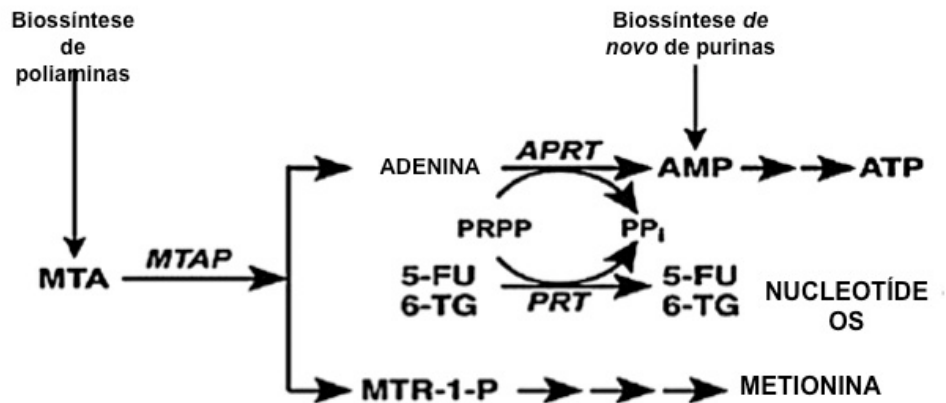


FIGURA 07 – VIA METABÓLICA DE MTAP

FONTE: Bertino *et al.*, 2011

LEGENDA: MTA, 5'-deoxy-5'-methylthioadenosine; APRT, adenina fosforibosil-transferase; AMP, adenina mono-fosfato; ATP, adenina tri-fosfato; PRPP, fosforibosil-1-pirofosfato; PPi, fosforibosil; PRT, fosforibosil-transferase; 5-FU, 5-fluorouracil; 6-TG, 6-tioguanina; MTR-1-P, 5-metiltioribose-1-fosfato.

3 JUSTIFICATIVA

Estudos de expressão vêm sendo utilizados com o objetivo de avaliar genes cujos níveis possam estar relacionados ao surgimento e progressão do câncer de mama, e assim fornecer uma melhor compreensão dos mecanismos da doença, além de marcadores prognósticos e preditivos. Análises que fazem comparações entre os tecidos tumoral e não-tumoral, e entre os diferentes subtipos de carcinomas mamários, são ferramentas importantes para a obtenção destes dados.

Os genes que atuam no reparo de *ICLs* do DNA, especificamente os da via *FA-BRCA*, apresentam um forte potencial terapêutico, uma vez que as drogas comumente utilizadas no tratamento do câncer induzem este tipo de lesão no DNA, e a ausência de reparo da mesma influencia positivamente na resposta à terapia, diminuindo as possibilidades de resistência ao tratamento.

O produto do gene *MTAP* também apresenta potencial terapêutico no câncer, principalmente em relação à terapias seletivas às células tumorais. Este é um gene ainda pouco estudado nos carcinomas mamários, e a análise de sua expressão contribui para a melhor compreensão de seu comportamento nos tumores e tecidos não-tumorais.

Este estudo propõe a avaliação da expressão gênica e viabilidade de linhagens celulares de carcinomas mamários em relação aos genes cujos produtos estão envolvidos nos mecanismos de reparo ao dano no DNA e na biossíntese de poliaminas.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a expressão de genes da via *FA-BRCA* e do gene *MTAP* em carcinomas mamários.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Caracterizar o padrão de expressão dos genes *FANCA*, *FANCC*, *FANCD2*, *FANCF*, *BRCA1* e *PALB2* em amostras de tumores mamários esporádicos, comparando os níveis de expressão de mRNA entre os subgrupos amostrais (de acordo com os parâmetros clínico-patológicos).
- b) Caracterizar a expressão gênica de *MTAP* na mesma amostra de tumores mamários esporádicos, em uma amostra de tumores luminais e triplo-negativos e em linhagens celulares de carcinomas mamários.
- c) Caracterizar a expressão protéica de *MTAP* nas linhagens celulares de carcinomas mamários.
- d) Investigar a ocorrência de metilação no promotor do gene *MTAP* nas linhagens celulares de carcinomas mamários.
- e) Verificar a sensibilidade celular a fármacos previamente selecionados, que atuam nas vias específicas de reparo do DNA e progressão tumoral, às quais fazem parte os genes em estudo.
- f) Avaliar a viabilidade celular de linhagens de carcinomas mamários, frente aos fármacos selecionados, antes e após o silenciamento da expressão do gene *MTAP*.

Os resultados e discussões referentes aos genes *FA-BRCA* e ao gene *MTAP* serão apresentados na forma de artigos científicos.

5 CAPÍTULOS

5.1 CAPÍTULO I

Submitted to the journal **Clinical Breast Cancer**.

FANCD2 and BRCA1 have differential expression among the FA-BRCA genes in breast cancer.

Sarah Franco Vieira de Oliveira, PhD^a, Leandro Serino, B.S.^a, Marcos Euzébio Maciel, PhD^a, Cícero de Andrade Urban, PhD^b, Rubens Silveira de Lima, M.D.^b, Iglénir João Cavalli, PhD^a, Giovanna Damia, PhD^c, Massimo Broggini, PhD^c, Enilze Maria de Souza Fonseca Ribeiro, PhD^a

^a*Department of Genetics, Federal University of Parana, Centro Politécnico, Jardim das Américas, Curitiba, PR, 81531-970, Brazil*

^b*Breast Unit, Nossa Senhora das Graças Hospital, 433, Alcides Munhoz st., Curitiba, PR, 80810-120, Brazil*

^c*Laboratory of Molecular Pharmacology, Department of Oncology, Istituto di Ricerche Farmacologiche “Mario Negri,” La Masa st., 19, Milan, 20156, Italy.*

Funding sources: Fundação Araucária-CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), grant number 18565

Running title: Expression of *FA-BRCA* genes in breast cancer

Corresponding author: Enilze Maria de Souza Fonseca Ribeiro, PhD

Department of Genetics, Federal University of Parana, Centro Politécnico, Jardim das Américas, Curitiba, PR, 81531-970, Brazil. Fax: +55 (41) 3361-1793, E-mail address: eribeiro@ufpr.br

Number of words/characters in the abstract: 250/1392

Number of words/characters in the manuscript: 3,542/20,141

Conflict of Interest:

All authors have no conflicts of interest.

Micro Abstract:

The mRNA expression level of *FA-BRCA* genes was evaluated in 46 primary breast tumors and ten normal breast samples. *FANCD2* was over expressed in tumors compared to the normal group, and *BRCA1* was under expressed in the Luminal-B compared to the Luminal-A group. *FANCD2* and *BRCA1* expression have strong clinical relevance and are known to influence patient response to different drugs.

Abstract

Introduction: The DNA repair status of tumors may play a role in tailoring patient therapy. The Fanconi anemia DNA repair pathway (FA-BRCA) operates in the repair of DNA interstrand crosslinks (ICLs). These lesions are induced by a variety of drugs that are used in cancer therapy. The goal of the present study was to evaluate the expression of FA-BRCA genes in primary breast tumors. **Materials and Methods:** We evaluated the mRNA expression of six genes (*FANCA*, *C*, *D2*, *F*, *BRCA1* and *PALB2*) using reverse transcribed quantitative PCR (RT-qPCR) in 46 fresh primary breast tumors and ten normal samples collected from the non-compromised contralateral breast. Correlations with the clinico-pathological parameters were also determined. Non-parametric tests were chosen to analyze gene expression in the various groups. **Results:** *FANCD2* expression was two times greater in tumors (invasive ductal carcinomas) than in the non-compromised group ($p = 0.02$). Tumor samples were also classified based on the intrinsic subtypes of breast cancer. *BRCA1* expression was three times lower in the Luminal-B group than in the Luminal-A group ($p = 0.01$). **Conclusion:** *FANCD2* and *BRCA1* expression have strong clinical relevance. The increased expression of *FANCD2* in tumors may indicate activation of the FA-BRCA pathway, which contributes to the carcinogenic process and has been correlated with resistance to chemotherapeutic agents. The loss of *BRCA1* expression in the Luminal-B group may indicate that the use of cisplatin-based adjuvant therapies is preferable and that the use of taxol-based therapies should be avoided due to the risk of drug resistance.

Keywords: *FANCD2*; *BRCA1*; gene expression; therapy; breast cancer

Introduction:

Breast cancer is the most frequently diagnosed cancer and the leading cause of cancer death in females worldwide [1]. In Brazil, it is the leading cause of cancer among women, with an estimated 52 cases for every 100 thousand inhabitants [2]. Among the alterations involved in the development and progression of this disease, the loss of expression of tumor suppressor genes (TSGs) is of great importance because TSGs are usually involved in cell cycle control and DNA damage repair pathways. A variety of genetic alterations may be responsible for the inactivation of TSGs, including deletions, allelic imbalances, mutations and gene promoter hypermethylation [3].

Perou et al. [4] and Sorlie et al. [5] described five individual subclasses of breast cancer using microarray technology and global gene expression profiling. The five groups are: *Luminal-A* (estrogen receptor (ER)-positive, low proliferation rate and low grade), *Luminal-B* (ER-positive, may express low levels of hormone receptors, of high grade and high proliferation rate), *Basal-like* (often ER-negative, progesterone receptor (PR)-negative, ERBB2-negative and display a cytokeratin expression pattern), *HER2+* (*ERBB2* gene amplification and high expression) and *Normal-like* (expression of many adipose tissue and non-epithelial cell type genes, strong expression of basal epithelial genes and low expression of luminal epithelial genes).

More recently, new groups have been identified using microarray analyses [6]. The *HER2*-enriched subtype is not equivalent to the *HER2+* subtype because not all cases classified as the *HER2*-enriched subtype by microarray analysis were found to be *HER2+* using immunohistochemistry and *in situ* hybridization [7-9]. Molecular apocrine tumors are androgen receptor-positive and more commonly display *HER2* amplification than the luminal and basal-like subtypes [10-11]. The claudin-low subtype is a group of ER-negative tumors that is characterized by high levels of expression of genes involved in the epithelial-to-mesenchymal transition (vimentin, Snail-1, Snail-2, TWIST1, TWIST2, ZEB1 and ZEB2), and down-regulation of genes involved in cell adhesion (E-cadherin and claudins 3, 4 and 7) [12]. The interferon-rich subtype was identified in 2006 [13] and is characterized by the high expression of interferon-regulated genes, including STAT1, a transcription factor that is responsible for mediating interferon regulation of gene expression.

Gene expression profiles have provided insight into the complexity of breast tumors and can be used to provide prognostic information beyond that obtained using standard clinical assessments [7]. However, the cost of gene expression-profiling tools has limited their broad clinical use. A simplified clinico-pathological classification system based on routinely assessed immunohistochemical markers, such as ER, PR, ERBB2 and Ki-67, has been adopted as a useful shorthand. Although it is not always feasible to perform Ki-67 staining due to the cost and time required, simple hematoxylin and eosin staining can be used to assess the histological grades of tumors [14].

Expression analyses of DNA repair genes, such as those in the Fanconi Anemia DNA repair pathway (*FA-BRCA*), often result in clinically relevant data, highlighting mechanisms related to tumor progression and drug response that may

be used to develop appropriate therapeutic strategies. If these genes are found to be hyper-expressed in some tumors relative to others, this may suggest that therapeutic strategies that induce lesions and that are repaired by these pathways are not suitable for these tumors because these lesions can be more efficiently repaired. Moreover, if these genes are expressed at lower levels in tumors compared to non-compromised tissues, this may demonstrate that this is one of the mechanisms that increase tumor progression-related genomic instability, which may be useful in developing new molecular therapies that are more specific and efficient with fewer side effects [15].

Fanconi anemia (FA) is a recessive disorder associated with pancytopenia, developmental defects and predisposition to malignancies, such as leukemias and squamous cell carcinomas. FA cells are characterized by spontaneous chromosomal instability and hypersensitivity to DNA cross-linking agents, such as mitomycin-C (MMC), cisplatin and diepoxybutane (DEB) [16-17]. The diagnostic test for FA is based on the ability of DEB to induce chromosomal breakage in lymphocytes. Currently, fifteen FA genes have been identified (*FANCA*, *C*, *D1*, *D2*, *E-G*, *I*, *J* and *L-P*) [18-19]. These genes are involved in homologous recombination (HR) and act specifically during the repair of DNA interstrand crosslinks (ICLs). ICLs prevent the separation of the strands of the double helix, resulting in a range of structural changes to DNA. They are caused by agents that may or may not generate large structural distortions in DNA, such as cisplatin and MMC [20-21]. These distorting ICLs are directly recognizable by the DNA repair machinery. Non-distorting ICLs act as barriers to processes that require translocation along the DNA, and their detection depends on genomic transactions that occur in their vicinity [18].

The *FANCA*-C, E-G, L and M proteins, and the accessory components FAAP20, 24 and 100, form the core-complex, which recognizes DNA lesions through FANCM and is required to monoubiquitinate the FANCI and FANCD2 proteins (the ID complex). Once the ID complex become ubiquitinated, the FAN1 protein (FANCD2 associated nuclease) binds and localizes the ID complex with the downstream effectors FANCN (PALB2), J (BRIP1), O (RAD51C), D1 (BRCA2) and SLX4 [11].

Patients lacking BRCA1/2 proteins are hypersensitive to cross-linking agents. BRCA2 is a direct regulator of RAD51, an essential protein for HR repair [22]. Although BRCA1 is mainly involved in hereditary breast cancer [23], it has also been implicated in sporadic breast cancer [24-25]. The link between FA and BRCA genes

was identified by the discovery that the inheritance of two copies of mutated *BRCA2* resulted in the formation of FA complementation group D1 (FANCD1) [26]. Mutations at the *BRCA1* gene were not associated with any complementation group of the disease, but were associated with the BRIP1 protein, which directly interacts with BRCA1 and was recognized as complementation group J [27-29]. Litman et al. [30] discovered that the FA and BRCA pathways are mutually dependent upon one another for their location at the nuclear foci.

The aim of the present study was to evaluate the mRNA expression profile of *FA-BRCA* genes in a well-characterized sample of primary invasive breast tumors compared to a group of non-compromised tissues of the contralateral breast and to correlate the expression of these genes with clinico-pathological parameters.

Materials and Methods:

Experimental samples: Forty-six primary breast tumors were obtained from 45 patients undergoing partial or complete mastectomies at *Hospital Nossa Senhora das Graças* and *Hospital das Clínicas*, Curitiba, in the state of Paraná, Brazil. Non-compromised tissues from the contralateral breast were obtained from ten patients who underwent mastectomy and mammoplasty for simultaneous breast symmetrization. Tumor and non-compromised samples were conserved in an RNA stabilization solution (*RNAlater*®, *Ambion Inc. Applied Biosystems*) immediately after surgery and were stored at 4 °C prior to RNA isolation. Clinico-pathological data were obtained from the pathology service of the hospitals (Table 1). None of the patients had any family history of hereditary breast or ovarian cancer. The average age of the patients was 59.3 ± 16.3 years and ranged from 31 to 97 years old. Patients had received neither chemotherapy nor radiation prior to surgery. Informed consent was obtained from all patients and the local Ethics Committee approved the study.

The intrinsic subtype classification was based on the 12th St. Gallen Guidelines [14], which define breast tumors based on immunohistochemical staining of ER, PR, ERBB2 and Ki-67 markers, as well as histological grade [31-32]. Luminal-A breast cancer was defined as ER positive and/or PR positive and ERBB2 negative. Luminal-B breast cancer was defined as ER positive and/or PR positive, ERBB2 positive or ERBB2 negative and grade III. The ERBB2+ subtype of breast cancer was defined as ER negative, PR negative and ERBB2 positive. Triple negative breast

cancer (TNBC) was defined as ER negative, PR negative and ERBB2 negative.

RNA isolation and RT-qPCR: Tumor fragments were homogenized using an RNA lysis buffer, and RNA was purified using the RNeasy[®] Kit (Qiagen) with Dnase digestion. The RNA integrity was controlled on a 1% agarose gel, and RNA concentrations were measured using a NanoDrop[™] 2000 spectrophotometer (Thermo Scientific). Retro-transcription of 1,200 ng of RNA to cDNA was performed using the High Capacity cDNA Reverse Transcription[®] Kit (Applied Biosystems). Optimal primer pairs spanning splice junctions were chosen using the PRIMER-3 (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) and Oligo Analyzer (<http://www.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer/>) software programs (Table 2). The specificity was verified both *in silico* and by detecting single-band amplicons of the PCR products. Actin (*ACTB*) and β -2-microglobulin (*B2M*) were used as internal references (housekeeping genes). They were chosen using the TaqMan[®] Human Endogenous Control Array microfluidic card (Applied Biosystems).

Relative gene expression was determined using RT-qPCR on a Mastercycler ep RealPlex system (Eppendorf). Standard curves for each gene were included for efficiency reaction analyses, which are necessary for the comparative method ($-\Delta\Delta Ct$). Briefly, 2 μ l of cDNA template (15 ng), 2 pmol of forward and reverse primers and 5 μ l of SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) in a total volume of 10 μ l were applied. The sets of primers used are shown in Table 2. The following PCR program was performed: Two minutes at 50 °C, ten minutes at 95 °C (initial denaturation), 15 seconds at 95 °C and one minute at the annealing temperature. These steps were repeated a total of 40 times (amplification). The PCR reactions were evaluated using a melting curve analysis according to the manufacturer's recommended instructions.

Statistical analyses: Thresholds and baselines from RT-qPCR data were manually adjusted. Normalization was conducted using the relative expression of the housekeeping genes. The normalized values were evaluated using the Shapiro-Wilk normality test, which displayed a non-normal distribution. A non-parametric Mann-Whitney test was chosen to analyze the differences in gene expression between the groups (tumor vs. normal samples, positive-lymph nodes vs. negative-lymph nodes, histological grade I/II vs. III, ER-positive vs. ER-negative, PR-positive vs. PR-negative and ERBB2-positive vs. ERBB2-negative), and a linear regression test was used to correlate gene expression with patient's age and tumor size. All statistical

analyses were carried out using Prism 5 version 5.04 (*GraphPad Software Inc.*). A two tailed p -value of <0.05 was considered to be statistically significant.

Results:

To perform the gene expression analyses, the tumors were classified based on IDC ($n = 36$) and the intrinsic subtypes ($n = 46$). The relative expression levels of *FA-BRCA* genes in IDC and non-compromised breast tissues are shown in Table 3. The only statistically significant value was obtained for *FANCD2*, the expression of which was 1.96 times higher in IDC than in normal tissues ($p = 0.02$).

The Kruskal-Wallis test revealed that these genes were differentially expressed in relation to the others when the IDC and non-compromised samples were compared ($p < 0.0001$, $p = 0.02$, respectively). Using Dunn's Multiple Comparison Test, the expression of the *BRCA1* gene was found to be 3.66 times higher than the expression of the *FANCD2* gene ($p < 0.05$) in the normal samples. All of the other combinations in the normal samples displayed non-significant differences in expression. Among the IDC tumors, *FANCA* was more highly expressed than *FANCD2*, *FANCF* and *PALB2*; *FANCC* was more highly expressed than *FANCF*; and *BRCA1* was more highly expressed than *FANCC*, *FANCD2*, *FANCF* and *PALB2* ($p < 0.05$).

No significant differences were found between gene expression and clinico-pathological parameters, such as local metastatic status (lymph node invasion), tumor grade (I/II vs. III), hormonal receptor status (ER/PR) and ERBB2 amplification (positive or negative). The only exception was the *BRCA1* gene, the expression of which was 3.17 times higher in PR-positive patients than in PR-negative patients ($p = 0.03$). Using the regression coefficient test, no correlations were found between gene expression and variations in tumor size and age at diagnosis.

When the samples were classified based on the intrinsic subtypes, only an analysis between the Luminal-A and Luminal-B groups could be performed due to the limited number of samples in the other subgroups. We found that the expression of the *BRCA1* gene was 2.66 times higher in Luminal-A tumors than in Luminal-B tumors ($p = 0.01$). The differences in expression among the other genes were not statistically significant (Table 4).

Discussion:

Our data indicate that *FANCD2* expression is nearly two times higher in IDC than in normal samples. We did not observe any differences between the two groups in the expression of the other FA genes analyzed. The *FANCD2* protein is of importance in the *FA-BRCA* pathway: Once it has been monoubiquitylated by the FA core-complex, it translocates to chromatin and co-localizes with BRCA1, BRCA2 and the recombinase, RAD51, in DNA damage inducible foci [33]. Our results are in agreement with those of Ozawa et al. [17], Kao et al. [34], and Ganzinelli et al. [25]. Kao et al. [34] found that the expression of FA genes was significantly elevated in malignant melanomas (MM; 40 samples) when compared with normal skin. Further, the main melanoma-specific signature was provided by the aggregate expression of FANCL and FANCD2, which was at least 50% higher than in normal skin samples. These results indicated that activation of the *FA-BRCA* pathway may contribute to carcinogenesis and resistance to chemotherapy, and suggested that inhibition of this pathway may be a potential therapeutic strategy for melanoma. In a study of ovarian tumors, Ganzinelli et al. [25] investigated the mRNA expression levels of genes from different DNA repair pathways. The expression of genes involved in the *FA-BRCA* pathway (*BRCA1*, *FANCA*, *FANCC*, *FANCD2* and *FANCF*) and in checkpoint function was observed to be significantly more elevated in carcinoma stage I (77 samples) than in borderline stage I (13 samples), suggesting that malignant transformation is associated with the up-regulation of genes involved in DNA repair and the maintenance of genomic stability. In a study of colorectal cancer [17], *FANCD2* mRNA expression was also significantly higher in the tumors than in the normal tissues of five patients. In addition, when 30 resected colon cancer specimens were analyzed, 70% were observed to have higher FANCD2 protein expression than in the corresponding normal tissues. High *FANCD2* expression in patients with lymph node and liver metastases or recurrence was also observed (133 patients).

In contrast, some studies have indicated that a failure to express *FANCD2* may play a role in the development of sporadic breast cancer [35-37]. These studies suggest that the loss of *FANCD2* expression causes chromosome instability and inhibition of normal cell differentiation, and plays an important role in malignant transformation and tumorigenesis. Recently, Duan et al. [38] suggested a method

based on western immunoblotting to evaluate FANCD2 protein monoubiquitination in tumor tissues. The ratio of FANCD2 foci-negative breast tumors was 29.4%. Duan et al. hypothesized that if FA-defective tumors are sensitive to ICL agents and PARP inhibitors, this simple test may have widespread applications.

We did not observe any correlation between *FANCD2* expression and clinico-pathological parameters. In addition, Zhang et al. [37] did not find any association between *FANCD2* expression and breast tumor markers (age, ER, PR, tumor size and lymph node metastasis) in 162 breast tumor specimens.

Some studies have reported that *FA-BRCA* pathway activity is closely correlated with the levels of FA gene transcripts [39-40]. In addition, ID complex formation is an established hallmark of pathway activation [41]. These reports suggest that the *FA-BRCA* pathway may activate oncogenesis, in addition to its previously implicated role as a TSG [42-43]. The activation of this pathway may provide resistance to increased endogenous DNA damage, which is typically observed in oncogenic states [44], and confer a survival advantage to tumor cells. Supporting this hypothesis, activation of the *FA-BRCA* pathway has been associated with resistance to a variety of DNA-damaging agents, such as cyclophosphamide [45]. One possible explanation for the observed *FANCD2* up-regulation in the present study comes from a melanoma pathogenesis analysis, in which the E2F transcription factor and NF- κ B seemed to activate *FANCD2* by binding to promoter or consensus promoter response elements [40,45]. The aberrant regulation of such transcription factors during melanomagenesis may account for the increased gene transcription.

Another important result of our study is related to the *BRCA1* gene. *BRCA1* mutations are found in 45% of inherited breast cancers and in up to 80% of breast/ovarian cancer families [46]. *BRCA1* presented the strongest expression of all of the evaluated genes in both the tumor and non-compromised groups (Table 3), but the differences in the expression between these two groups were not statistically significant. Additionally, we observed a 2.7 fold loss of expression of *BRCA1* in the Luminal-B group compared to the Luminal-A group (Table 6). These results are in accordance with those of Ganzinelli et al. [25], which revealed a down-regulation of *BRCA1* in more aggressive stages of ovarian tumors. Recently, Ribeiro et al. (47) found that the expression of *BRCA1* in a group of 80 TNBCs was lower than that in 70 Luminal-A tumors. Taken together, these results suggest that *BRCA1* down regulation occurs in the most aggressive subtypes of the disease, which may be

responsible for increased genomic instability. The observed loss of expression of *BRCA1* in the Luminal-B group may be related to promoter hypermethylation because aberrant methylation of this gene has been found in 11 to 14% of sporadic breast cancers [48]. Moreover, methylation is often associated with loss of heterozygosity (LOH) of the other allele [49]. However, some cancers seem to have low-levels of *BRCA1* expression even in the absence of promoter methylation [49-50]. We did not observe any differences in the expression of the other FA genes between the luminal groups.

BRCA1 mRNA expression can be exploited for the treatment of breast tumors with different classes of drugs. Van der Groep et al. [16] suggested that like FA cells, cells lacking *BRCA1/2* proteins are hypersensitive to DNA cross-linking agents (such as cisplatin). *BRCA1* mutations or reduced *BRCA1* expression may maintain sensitivity to platinum-based chemotherapy. Thus, *BRCA1* may favorably influence prognosis [51]. Alan & D'Andrea [52] delineated that tumors with *BRCA1/2* mutations depend to a large degree on the Base Excision Repair (BER) process, and Poly-ADP ribose polymerase 1 (PARP1) is a critical enzyme for BER. Consequently, tumors with defects in homologous recombination genes (such as *FA-BRCA* genes) are also hypersensitive to PARP inhibitors [53-54], expanding the utility of this class of drugs to non *BRCA1*-mutated patients [55]. Recently, Gao et al. [56] observed that *BRCA1* up-regulation is notably associated with DNA repair-mediated resistance to cisplatin and that *BRCA1* down-regulation confers resistance to taxanes (such as docetaxel and paclitaxel). Gao et al. also clinically confirmed that *BRCA1* mutations or mRNA and protein alterations affect the response to cisplatin or paclitaxel-based chemotherapy, as well as influence survival in a number of malignancies, including breast cancer. Therefore, *BRCA1* down-regulation in Luminal-B breast cancer patients could be a valid indicator of the success of cisplatin-based treatment. In addition, docetaxel-based therapy should be avoided, and Luminal-B patients may benefit from treatment with PARP inhibitors. Ren et al. [57] suggested that *BRCA1* and *RRM1* mRNA levels could be used as biomarkers in individual therapy in non-small cell lung cancer (NSCLC), and a randomized clinical trial is underway at their institution to further confirm this finding. Yuanming et al. [58] found that the decreased expression of the ERCC1 and *BRCA1* proteins is associated with poor prognosis in metastatic colorectal cancer and that these proteins could be used as prognostic biomarkers.

Of the 36 total IDC patients, 19 (53%) received some type of cyclophosphamide-based adjuvant regimen (which may confer resistance in these patients), 13 (36%) received a hormonal therapy (tamoxifen or aromatase inhibitors) only and 4 (11%) did not receive adjuvant therapies. In addition, four Luminal-B patients received adjuvant paclitaxel-based treatments, which may result in the development of resistance. It is of utmost importance to analyze the expression of DNA repair genes, such as those in the *FA-BRCA* pathway, in breast cancer patients because these genes may interfere with the response to treatment and, consequently, improve the disease free survival (DFS) and overall survival (OS) of the patients.

In Brazil, the majority of breast cancer patients do not have access to new-targeted therapies, such as herceptin for ERBB2+ patients, due to the high cost of treatment with these drugs, which are not funded by the government. Thus, there is a need for new predictive biomarkers in breast cancer, especially for more aggressive tumors (such as Luminal-B, ERBB2+ and TNBC), with the aim of better distinguishing which patients will benefit from standard chemotherapy regimens. The *FA-BRCA* pathway may offer relevant possibilities in this field.

Conclusions:

Expression analyses of genes that act on DNA repair may reveal mechanisms related to tumor progression and drug response, suggesting appropriate therapeutic strategies. The aim of the present study was to evaluate the mRNA expression levels of *FA-BRCA* genes in a well-characterized sample of 46 primary invasive breast tumors, comparing the expression levels with non-compromised tissues of the contralateral breast and correlating them with clinico-pathological parameters. In summary, we found that the *FANCD2* gene is transcriptionally up-regulated in IDC in comparison to non-compromised tissues. In the context of the broader literature, this result suggests that activation of the *FA-BRCA* pathway may contribute to breast tumorigenesis and resistance to chemotherapy. We found that *BRCA1* is transcriptionally down-regulated in Luminal-B in comparison to Luminal-A tumors. This result suggests that Luminal-B patients may benefit from cisplatin and should avoid taxane-based treatments. In addition, PARP inhibitors may be another potential therapeutic strategy for Luminal-B breast cancer patients. It is important to expand

the number of samples used in this study, performing correlation analyses with drug response and survival prognostic factors, such as DFS and OS.

Clinical Practice Points:

DNA repair genes were found to be hyper-expressed in some tumors, suggesting that therapeutic strategies that induce lesions that are repaired by these pathways are not suitable for these types of tumors. DNA repair genes that were found to be expressed at lower levels in tumors than in normal tissues demonstrate that this specific pathway may be one of the mechanisms that can be used to increase the genomic instability that is related to tumor progression. *FANCD2* expression has previously been observed to be elevated in tumors compared to normal tissues, and *BRCA1* expression has previously been observed to be down-regulated in tumors compared to normal tissues, as well as in more aggressive cancers compared to less aggressive ones. We found relevant differences in the expression of the *FANCD2* and *BRCA1* genes between IDC and normal breast tissues, and Luminal-B and Luminal-A breast tumors, respectively, in a well-characterized sample of Brazilian breast cancer patients. These findings may impact the clinical courses of these patients because the results of some studies have suggested that *FANCD2* hyper-expression is correlated with cyclophosphamide resistance (which has been observed with major therapeutic regimens). These finding also indicate that *BRCA1* down-regulation is correlated with taxane resistance and that patients may benefit from cisplatin treatment. PARP inhibitors could be another potential therapeutic strategy for Luminal-B breast cancer patients with *BRCA1* loss of expression. The *FA-BRCA* pathway is an important source of new predictive biomarkers for breast cancer.

Acknowledgements:

We would like to thank the CAPES-PSDE (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior), case number 4623/11, and the Mario Negri Institute for Pharmacologic Research (Milan, Italy) for the scholarship support.

References:

1. Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global Cancer Statistics. *Cancer J. Clin* 2011; 61:69-90.
2. INCA Instituto Nacional do Cancer. Ministério da Saude. Estimativa 2012. Available at: <http://www1.inca.gov.br/estimativa/2012/>. Last accessed on 24 September 2012.
3. Kim J, Kim MA, Min SY, et al. Downregulation of Methylthioadenosina Phosphorylase by Homozygous Deletion in Gastric Carcinoma. *Genes, Chromosomes Cancer* 2011; 50:421-433.
4. Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000; 6797:747-752.
5. Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci* 2003; 14:8418-8423.
6. Jones RL, Constantinidou A, Reis-Filho JS. Molecular Classification of Breast Cancer. *Surgical Pathology* 2012; 5:701-717.
7. Parker JS, Mullins M, Cheang MCU, et al. Supervised Risk Predictor of Breast Cancer Based on Intrinsic Subtypes. *J Clin Oncol* 2009; 27:1160-1167.
8. Weigelt B, Mackay A, A'Hern R, et al. Breast cancer molecular profiling with single sample predictors: a retrospective analysis. *Lancet Oncol* 2010; 11:339-349.
9. de Ronde JJ, Hannemann J, Halfwerk H, et al. Concordance of clinical and molecular breast cancer subtyping in the context of preoperative chemotherapy response. *Breast Cancer Res Treat* 2010; 119:119-126.
10. Farmer P, Bonnefoi H, Becette V, et al. Identification of molecular apocrine breast tumours by microarray analysis. *Oncogene* 2005; 24:4660-4671.
11. Doane AS, Danso M, Lal P, et al. An estrogen receptor-negative breast cancer subset characterized by a hormonally regulated transcriptional program and response to androgen. *Oncogene* 2006; 25:3994-4008.
12. Prat A, Parker JS, Karginova O, et al. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Res* 2010; 12:R68.
13. Hu Z, Fan C, Oh DS, et al. The molecular portraits of breast tumors are conserved across microarray platforms. *BMC Genomics* 2006; 7:96.
14. Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, et al. Strategies for subtypes—dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. *Ann Oncol* 2011; 22:1736-1747.
15. Altieri F, Grillo C, Maceroni M, et al. DNA Damage and Repair: From Molecular Mechanisms to Health Implications. *Antioxidants Redox Signaling* 2008; 10: 891-937.
16. Van der Groep P, Hoelzel M, Buerger H, et al. Loss of expression of FANCD2 protein in sporadic and hereditary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2008; 107:41-47.
17. Ozawa H, Iwatsuki M, Mimori K, et al. FANCD2 mRNA Overexpression is a Bona Fide Indicator of Lymph Node Metastasis in Human Colorectal Cancer. *Ann Surg Oncol* 2010; 17:2341-2348.

18. Jones MJK, Huang TT. The Fanconi anemia pathway in replication stress and DNA crosslink repair. *C. Cell Mol Life Sci* 2012; DOI 10.1007/s00018-012-1051-0.
19. Hays LE. Multifunctionality of the FA pathway. *Blood* 2013 Jan 3;121(1):3-4.
20. Noll DM, Mason TM, Miller PS. Formation and repair of interstrand cross-links in DNA. *Chem Rev* 2006; 106:277–301.
21. Smeaton MB, Hlavin EM, McGregor Mason T, et al. Distortion-dependent unhooking of interstrand cross-links in mammalian cell extracts. *Biochemistry* 2008; 47:9920–9930.
22. Deans AJ, West SC. DNA interstrand crosslink repair and cancer. *Nat Rev Cancer* 2011; 11:467–480.
23. Dorsman JC, Levitus M, Rockx D, et al. Identification of the Fanconi anemia complementation group I gene, FANCI. *Cell Oncol* 2007; 29(3):211–218.
24. Durkin SG, Glover TW. Chromosome fragile sites. *Annu Rev Genet* 2007; 41:169–192.
25. Ganzinelli M, Mariani P, Cattaneo D, et al. Expression of DNA repair genes in ovarian cancer samples: Biological and clinical considerations. *Eur J Cancer* 2011; 47:1086-1094.
26. Howlett NG. Fanconi anemia, breast and embryonal cancer risk revisited. *Eur J Hum Gen* 2007; 15:715–717.
27. Litman R, Peng M, Jin Z, et al. BACH1 is critical for homologous recombination and appears to be the Fanconi anemia gene product FANCI. *Cancer Cell* 2005; 3:255-265.
28. Levan O, Attwooll C, Henry RT, et al. The BRCA1-interacting helicase BRIP1 is deficient in Fanconi anemia. *Nat Genet* 2005; 9:931-933.
29. Levitus M, Joenje H, de Winter JP. The Fanconi anemia pathway of genomic maintenance. *Cell Oncol* 2006; 28:3-29.
30. Litman R, Gupta R, Brosh Jr. RM, et al. BRCA-FA pathway as a target for anti-tumor drugs. *Anticancer Agents Med Chem* 2008; 8:426–430.
31. Cheang MCU, Voduc D, Bajdik C, et al. Basal-Like Breast Cancer Defined by Five Biomarkers Has Superior Prognostic Value than Triple-Negative Phenotype. *Clin Cancer Res* 2008; 14:1368-1376.
32. Lin C, Chien SY, Chen LS, et al. Triple negative breast carcinoma is a prognostic factor in Taiwanese women. *BMC Cancer* 2009; 9:192.
33. Rudland PS, Platt-Higgins AM, Davies LM, et al. Significance of the Fanconi Anemia FANCD2 Protein in Sporadic and Metastatic Human Breast Cancer. *Am J Pathol* 2010; 176:2935-2947.
34. Kao WH, Riker AI, Kushwaha DS, et al. Upregulation of Fanconi Anemia DNA Repair Genes in Melanoma Compared to Non-Melanoma Skin Cancer. *J Invest Dermatol* 2011; 10:2139–2142.
35. Pejovic T, Yates JE, Liu HY, et al. Cytogenetic instability in ovarian epithelial cells from women at risk of ovarian cancer. *Cancer Res* 2006; 66:9017–9025.
36. Mathew CG. Fanconi anaemia genes and susceptibility to cancer. *Oncogene* 2006; 25:5875–5884.
37. Zhang B, Chen R, Lu J, et al. Expression of FANCD2 in Sporadic Breast Cancer and Clinicopathological Analysis. *J Huazhong Univ Sci Technol* 2010; 3:322-325.
38. Duan W, Gao L, Zhao W, et al. Assessment of FANCD2 nuclear foci formation in paraffin-embedded tumors: a potential patient- enrichment strategy for

- treatment with DNA interstrand crosslinking agents. *Translational Research* 2013;161:156–164.
39. Taniguchi T, Garcia-Higuera I, Andreassen PR, et al. S-phase-specific interaction of the Fanconi anemia protein, FANCD2, with BRCA1 and RAD51. *Blood* 2002; 100:2414–2420.
 40. Hoskins EE, Gunawardena RW, Habash KB, et al. Coordinate regulation of Fanconi anemia gene expression occurs through the Rb/E2F pathway. *Oncogene* 2008; 27:4798–4808.
 41. Kee Y, D'Andrea AD. Expanded roles of the Fanconi anemia pathway in preserving genomic stability. *Genes Dev* 2010; 24:1680–1694.
 42. Condie A, Powles RL, Hudson CD, et al. Analysis of the Fanconi anaemia complementation group A gene in acute myeloid leukaemia. *Leuk Lymphoma* 2002; 43:1849–1853.
 43. Nitta M, Kozono D, Kennedy R, et al. Targeting EGFR induced oxidative stress by PARP1 inhibition in glioblastoma therapy. *PloS ONE* 2010; 5:e10767.
 44. Chen CC, Taniguchi T, D'Andrea A. The Fanconi anemia (FA) pathway confers glioma resistance to DNA alkylating agents. *J Mol Med* 2007; 85:497–509.
 45. Yarde DN, Oliveira V, Mathews L, et al. Targeting the Fanconi anemia/ BRCA pathway circumvents drug resistance in multiple myeloma. *Cancer Res* 2009; 69:9367–9375.
 46. Mullan PB, Gorski JJ, Harkin DP. BRCA1—a good predictive marker of drug sensitivity in breast cancer treatment? *Biochim Biophys Acta* 2006; 1766:205–216.
 47. Ribeiro E, Ganzinelli M, Andreis D, et al. Triple Negative Breast Cancers Have a Reduced Expression of DNA Repair Genes. *PloS ONE* 2013; 8: e66243.
 48. Rice JC, Ozcelik H, Maxeiner P, et al. Methylation of the BRCA1 promoter is associated with decreased BRCA1 mRNA levels in clinical breast cancer specimens. *Carcinogenesis* 2000; 21:1761–1765.
 49. Staff S, Isola J, Tanner M. Haplo-insufficiency of *BRCA1* in sporadic breast cancer. *Cancer Res* 2003; 63:4978–4983.
 50. Magdinier F, Ribieras S, Lenoir GM, et al. Down-regulation of BRCA1 in human sporadic breast cancer; analysis of DNA methylation patterns of the putative promoter region. *Oncogene* 1998; 17:3169–3176.
 51. Lambie H, Miremadi A, Pinder SE, et al. Prognostic significance of BRCA1 expression in sporadic breast carcinomas. *J Pathol* 2003; 200:207–213.
 52. Alan D & D'Andrea MD. The Fanconi Anemia and Breast Cancer Susceptibility Pathways. *N Engl J Med* 2010; 362:1909–1919.
 53. Bryant HE, Helleday T. Inhibition of poly (ADP-ribose) polymerase activates ATM which is required for subsequent homologous recombination repair. *Nucleic acids res* 2006; 34:1685–1691.
 54. Fong PC, Boss DS, Yap TA, et al. Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase in tumors from BRCA mutation carriers. *N Engl J Med* 2009; 361:123–34.
 55. Edwards SL, Brough R, Lord CJ, et al. Resistance to therapy caused by intragenic deletion in BRCA2. *Nature* 2008; 451:1111–1115.
 56. Gao Y, Zhu J, Zhang X, et al. BRCA1 mRNA Expression as a Predictive and Prognostic Marker in Advanced Esophageal Squamous Cell Carcinoma Treated with Cisplatin- or Docetaxel-Based Chemotherapy/Chemoradiotherapy. *PloS ONE* 2013; 8: e52589

57. Ren S, Li A.; Zhou S, et al. Individualized Chemotherapy in Advanced NSCLC Patients Based on mRNA Levels of BRCA1 and RRM1. *Chin J Cancer Res* 2012; 24:226-231.
58. Yuanming L, Lineng Z, Baorong S, et al. BRCA1 and ERCC1 mRNA levels are associated with lymph node metastasis in Chinese patients with colorectal cancer. *BMC Cancer* 2013, 13:103.

Subtypes	Number of Patients	%
IDC	36	78.26
ILC	3	6.52
Mixed	4	8.70
Others ^a	3	6.52
Intrinsic Subtypes		
Luminal-A	23	54.80
Luminal-B	14	33.30
ERBB2 +	2	4.80
TNBC	3	7.14
Not-informed	4	
Lymph node metastasis		
Present	21	48.84
Absent	22	51.16
Not-informed	3	
Tumor grade		
I	6	13.64
II	28	63.64
III	10	22.72
Not-informed	2	
Tumor size		
≤ 20 mm	20	45.45
> 20 mm	24	54.55
Not-informed	02	
Estrogen receptor (ER)		
Positive	37	84.09
Negative	7	15.91
Not-informed	2	
Progesterone receptor (PR)		
Positive	38	86.36
Negative	6	13.64
Not-informed	2	
ERBB2 amplification		
Positive	9	21.43
Negative	33	78.57
Not-informed	4	

Table 1 – Clinico-pathological information

Legend: IDC, invasive ductal carcinoma; ILC, invasive lobular carcinoma; TNBC, triple negative breast cancer; mm, millimeters; ^a, mucinous carcinoma, tubular-lobular carcinoma, pleomorphic carcinoma.

Gene	Sense	Sequence	Amplicon Length (bp)
ACTB	F	5'-GATGCAGAAGGAGATCACTGC	75
	R	5'-AGTACTTGCGCTCAGGAGGA	
B2M	F	5'-TGACTTTGTCACAGCCCAAGATA	77
	R	5'-CGGCATCTTCAAACCTCCA	
BRCA1	F	5'- GCCAGAAAACACCACATCAC	99
	R	5'- CAGTGTCCGTTACACACAA	
FANCA	F	5'- GAGGTTCTTCAGTCATACCCTGA	84
	R	5'- TCTCTCTGCATCTGAACAGCA	
FANCC	F	5'- CCAGCCAGAGTTCTTTGAGG	90
	R	5'- CGAAGCCAGAGGCAGACTAC	
FANCD2	F	5'- CCCATCTGCTATGATGATGAA	81
	R	5'- CGTATTTGCTGAGGGGATATG	
FANCF	F	5'- GCTAGTCCACTGGCTTCTGG	95
	R	5'- GGTGGCGGCTAGTCACTAAA	
PALB2	F	5'- TGGGACCCTTTCTGATCAAC	83
	R	5'- GGGGCATCAAAAATTGGTTT	

Table 2 – RT-qPCR primers

Legend: F, forward; R, reverse; bp, base pairs

	<i>FANCA</i>	<i>FANCC</i>	<i>FANCD2</i>	<i>FANCF</i>	<i>BRCA1</i>	<i>PALB2</i>
IDC	3.12 (34)	1.50 (34)	1.23 (35)	0.80 (34)	5.15 (34)	0.94 (35)
NC	1.32 (8)	1.36 (10)	0.63 (10)	0.74 (8)	2.30 (10)	0.75 (10)
IDC/NC	2.36	1.10	1.96 ^a	1.08	2.24	1.25

Table 3 – Relative expression of *FA-BRCA* genes in the IDC and non-compromised groups

Legend: IDC, invasive ductal carcinomas; NC, non-compromised breast samples; (), number of samples; ^a, statistical significance: $p = 0.02$.

	<i>FANCA</i>	<i>FANCC</i>	<i>FANCD2</i>	<i>FANCF</i>	<i>BRCA1</i>	<i>PALB2</i>
Luminal-A	5.33 (21)	1.47 (21)	1.77 (22)	1.44 (21)	7.70 (21)	1.01 (22)
Luminal-B	2.98 (14)	1.54 (14)	1.13 (14)	0.69 (14)	2.89 (14)	0.87 (14)
LA/LB	1.79	0.95	1.57	2.09	2.66 ^a	1.16

Table 4 – Association analyses between *FA-BRCA* gene expression and the intrinsic subtypes

Legend: (), number of samples; LA/LB, Luminal-A/Luminal-B; ^a, statistical significance: $p = 0.01$.

5.2 CAPÍTULO II

Submitted to the journal **Breast Cancer Research and Treatment**.

***MTAP* loss of expression in TNBC in relation to Luminal-A breast tumors**

Sarah Franco Vieira de Oliveira¹, Monica Ganzinelli², Leandro Serino¹, Marcos Euzébio Maciel¹, Cícero de Andrade Urban³, Rubens Silveira de Lima³, Iglénir João Cavalli¹, Giovanna Damia², Massimo Broggin², Enilze Maria de Souza Fonseca Ribeiro^{1§}

¹Department of Genetics, Federal University of Paraná, Centro Politécnico, Jardim das Américas, Curitiba, PR, 81531-970, Brazil

²Laboratory of Molecular Pharmacology, Department of Oncology, Istituto di Ricerche Farmacologiche “Mario Negri,” La Masa st., 19, Milan, 20156, Italy.

³Department of Oncology and Breast Surgery, Hospital Nossa Senhora das Graças, 433, Alcides Munhoz st., Curitiba, PR, 80810-120, Brazil

§Corresponding author:

Enilze Maria de Souza Fonseca Ribeiro – email: eribeiro@ufpr.br. Tel: (+55) 41 3361-1555. Fax: (+55) 41 3361-1793

Abstract:

Introduction: methylthioadenosine phosphorylase (MTAP) is a ubiquitously expressed protein important to the salvage process of adenine and to methionine synthesis. It is localized at 9p21, a chromosomal region often deleted in cancer, including breast carcinomas. Several research groups have shown that *MTAP* acts as a tumor suppressor gene, and recently some therapeutic approaches have been proposed based on the *MTAP* status of the tumors. **Methods:** we performed an *MTAP* expression profile (gene and protein expression, methylation of the promoter region) in breast cancer cell lines, and evaluate the *MTAP* expression in two groups: one of fresh breast tumors and non-compromised epithelium from the contralateral breast, and another of Luminal-A and triple negative breast tumors (TNBC) from core-biopsy. Also, we inhibited the gene in an *MTAP*-positive cell line using endoribonuclease-

prepared small interference RNA (esiRNA), and performed cytotoxicity experiments with inhibitors of *de novo* adenine synthesis. Non-parametric tests were chosen to analyze gene expression between the various groups. *Results*: Among seven breast cancer cell lines, three shown a positive *MTAP* expression (MDA-MB-435, MDA-MB-468 and SK-BR-3); three were negative (MDA-MB-231, MCF-7 and ZR-75-I) and one shown a weak expression (T47-D) of *MTAP* gene. The difference of *MTAP* expression between fresh tumors and non-compromised tissues was not statistically significant. However, *MTAP* was found significantly more expressed in Luminal-A breast tumors than in TNBC, suggesting that it is lost in more aggressive breast tumors. We have also inactivated an *MTAP*-positive cell line (MDA-MB-435) by esiRNA transfection. The transfected *MTAP*-negative cells were significantly more sensitive to 5'-fluorouracil (5-FU) than the original cells. *Conclusions*: These results support recent proposed therapies based on the use of a toxic purine analog (like 5-FU) and a protective agent to selectively kill *MTAP*-negative tumors, and can be a new approach to treat *MTAP*-negative TNBC.

Keywords:

Breast cancer, *MTAP*, intrinsic subtypes, TNBC, 5-FU.

Introduction:

Breast cancer is the major cause of cancer among women in Brazil and worldwide [1-2]. One of the alterations involved in the development and progression of this disease is the loss of expression of tumor suppressor genes [3].

Methylthioadenosine phosphorylase (*MTAP*) gene is located at 9p21 and is flanked by the tumor suppressor *miR-31* and by cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (*CDKN2A*) gene [4], distant approximately 100 kb [5-9]. *MTAP* acts in the polyamine biosynthesis pathway, and is important to the adenine salvage and methionine synthesis [3]. Even being expressed in all normal tissues, *MTAP* is frequently lost in tumors mainly due to co-deletion with *CDKN2A*. In normal cells, *MTAP* cleaves 5'-deoxy-5'-methylthioadenosine (MTA) substrate generated during the biosynthesis of polyamines, generating adenine and 5-methylthioribose-1-phosphate (MTR-1-P). Adenine is converted to adenosine monophosphate (AMP), and MTR-1-P is converted to methionine. Cells lacking *MTAP* are unable to salvage AMP or methionine, and are more sensitive to inhibitors of *de novo* AMP synthesis or to methionine starvation than normal cells [10-11]. Because *MTAP* is expressed in all normal tissues and is usually lost in tumors, Kadariya et al. [12] suggested the use of *MTAP* deficiency to selectively target tumor cells that are *MTAP*-negative. A promising therapy in this field was proposed in 2009 by Lubin and Lubin [13], based

on the addition of MTA to the treatment of *MTAP*-negative tumors with toxic purine analogs, like 5-fluorouracil (5-FU). Normal cells are protected from the toxic effects of purine analogs, because AMP produced from MTA could compete with them. However, *MTAP*-negative tumor cells are not able to produce AMP from the MTA added, so the purine analogs are metabolized and exerts their toxic effects [14].

Despite lacking of information on *MTAP* deficiency in primary breast cancer, we previously reported a 90% frequency of concordant loss of heterozygosity (LOH) for intragenic microsatellite markers for *CDKN2A* (D9S1748) and *MTAP* (D9S1749) [15]. These data indicated that in breast cancer cells the co-deletion might have an important role, as described in other types of tumors. The aim of the present study was to analyze *MTAP* expression in breast cancer patients and cell lines and examine the relationship between *MTAP* expression and chemo-sensitivity to inhibitors of AMP synthesis.

Methods:

Experimental samples:

Forty-six fresh primary breast tumor samples were obtained between 2009 and 2010 from *Hospital Nossa Senhora das Graças* and *Hospital de Clinicas* (Curitiba, Brazil). Non-compromised tissues of the contralateral breasts were obtained from ten patients who underwent mastectomy and plastic surgery for breast symmetrization simultaneously. Tumor and non-compromised samples were conserved in an RNA stabilization solution (RNAlater®, Applied Biosystems, USA) immediately after surgery, and stored at 4 °C until RNA isolation. Clinico-pathological information of the patients is summarized in Table 1. Patients had received neither chemotherapy nor radiation prior to surgery. Written informed consent was obtained from patients and the local Ethics Committee approved the study.

A second group of 85 TNBC and 66 Luminal-A breast tumors was used to *MTAP* gene expression. These formalin-fixed paraffin embedded core (core-biopsy) samples were retrospectively collected from patients who came to the medical observation at the Breast Care Unit, A.O. *Istituti Ospitalieri di Cremona*, Italy. Ethical permission for the study was obtained from the hospital ethical committee. Written informed consent was obtained from patients. We did not have access to the clinico-

pathological data of these patients.

Intrinsic subtypes classification:

The intrinsic subtypes classification was based on St. Gallen guidelines [16], which define breast tumors according to the immunohistochemical staining of ER, PR, ERBB2 and Ki-67 markers and histological grade [17-18].

Cell lines and cell culture:

Seven breast cancer cell lines, obtained from “Mario Negri” Institute of Pharmacological Research, were used: MDA-MB-231, MDA-MB-435, MDA-MB-468, MCF7, SK-BR-3, T47-D and ZR-75-1. These cell lines were grown in RPMI-1640 medium supplemented with 1% L-glutamine (Biowest, French) and 10% fetal bovine serum (FBS; Sigma, EUA) at 37 °C and 5% of CO₂, and were used for nucleic acid and protein extractions and for cytotoxicity experiments. Prior to the experiments, cells were detached with 0.05% trypsin and 0.04% Ethylenediamine tetra-acetic acid (EDTA) in Phosphate Buffered Saline (PBS) (Biowest). For protein extraction, cells were detached by scrapping in PBS solution. Cells from each line were counted using the Multisizer™ 3 COULTER COUNTER® (Beckman Coulter, Inc. Fullerton, USA), then they were re-seeded for culture maintenance.

Reverse transcribed quantitative PCR (RT-qPCR):

RNA from fresh tumors and non-compromised samples were isolated using RNAeasy® Kit (Qiagen, Germany), and reverse transcription was done using High Capacity cDNA Reverse Transcription® Kit (Applied Biosystems). RNA from core-biopsy samples was isolated using High Pure RNA Paraffin Kit (Roche, USA), and reverse-transcribed using High Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems). RNA from cell lines was isolated using SV-Total RNA isolation system (Promega, USA), and reverse-transcribed with High Capacity cDNA Reverse Transcription® Kit (Applied Biosystems). The integrity of all RNA preparations was controlled on a 1% agarose gel and RNA concentrations were measured in a NanoDrop™ 1000 spectrophotometer (Thermo Scientific, USA).

Optimal primer pairs (Table 2) were chosen, spanning splice junctions, using PRIMER-3 (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) and *Oligo Analyzer* softwares (<http://www.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer/>). The specificity was verified by detecting single-band amplicons of the PCR products. Reactions were performed with 15 ng of cDNA template, 2 pmol of forward and reverse primers and 5 µl of SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), and the curve of dissociation was evaluated. Standard curves for each gene were included for efficiency reaction analysis, necessary to the comparative method ($-\Delta\Delta C_t$). Samples were then normalized using the housekeeping genes Actin (*ACTB*) and β -2-microglobulin (*B2M*). They were chosen using the TaqMan® Human Endogenous Control Array microfluidic card (Applied Biosystems). Sample plates were calibrated using inter-run calibrators samples, to correct for run to run technical variation.

Relative *MTAP* expression on fresh samples was determined on a Mastercycler ep RealPlex system (Eppendorf, Germany). To core-biopsy samples and cell lines, relative gene expression was performed using GoTaq qPCR Master Mix (Promega) in an ABI Prism 7900 Sequence Detection System (Applied Biosystems).

Western-blotting (WB):

Protein extracts from the seven breast cancer cell lines were obtained by using a lysis buffer (10 mM Tris-HCl (pH 7.4); 150 mM NaCl, 0.1% NP-40; 5 mM EDTA; 50 mM NaF) in the presence of protease inhibitors. Total cellular proteins (50 and 100 µg for CDKN2A and MTAP analysis, respectively) were separated on 12% SDS-polyacrylamide gels and electro-transferred to nitrocellulose or polyvinylidene fluoride (PVDF) membranes (Protran, Schleicher & Schuell, Germany). Immunoblotting was carried out with anti-CDKN2A (C-20), anti-MTAP (N-20) and anti- β -tubulin (H-235) (dilution 1:200, 1:100 and 1:500 in blocking buffer, respectively) antibodies, purchased from Santa Cruz Biotechnology Inc. (USA). Membranes were then reacted with secondary antibodies (dilution 1:3000 in blocking buffer, purchased from Santa Cruz Biotechnology) and developed using the ECL kit (Amersham Biosciences, Sweden).

Immunofluorescence (IMF):

Cells ($3.0\text{--}4.0 \times 10^4$) from the seven breast cancer cell lines were grown on poly-lysine cover glasses for 48 hours. They were fixed with 4% paraformaldehyde for 20 minutes, following permeabilization with Triton X-100 (0.5% in PBS) for five minutes and blocking in 2% Albumine Bovine Serum (BSA) and 0.2% Triton X-100 in PBS (blocking buffer) for one hour. Cells were subsequently incubated overnight with the polyclonal anti-MTAP primary antibody (N-20, Santa Cruz Biotechnology) diluted 1:50 in blocking buffer, and then fluorescein isothiocyanate (FITC) conjugated secondary antibody Alexa Fluor 488 (Invitrogen, Life Technologies, USA) was added to the cells diluted 1:800 in blocking buffer, for 1 hour. 4',6'-Diamidino-2-Phenylindole (DAPI) (Sigma, final concentration 30 ng/ml in PBS) was added to stain nuclei, and cells were mounted with 7 μ l of Vectashield® H-1000 Mounting Medium (Vector Laboratories, USA) and then observed in an IX81® motorized inverted microscope (Olympus Inc., Japan). These experiments were repeated four times. Due to technical reasons, we did not perform this approach with MCF-7 cells.

Methylation specific PCR (MS-PCR):

Genomic DNA was isolated from the seven breast cancer cell lines using Maxwell® 16 Cell DNA Purification Kit (Promega). Genomic DNA was modified with sodium bisulfite using the Epitect Bisulfite kit (Qiagen) according to manufacturer specifications. MS-PCR was performed in standard conditions by using GoTaq® Hot Start (Promega) and 2 μ l of the modified DNA. By targeting the sequence of CpG island in the promoter region of *MTAP* gene, specific primers recognizing DNA-methylated or non-methylated were designed (Table 2). MS-PCR products were separated on 2.5% agarose gels. These analyses were repeated twice. Due to technical reasons, we did not perform this approach with the SK-BR-3 cells.

Cytotoxicity experiments:

3.0×10^4 to 4.0×10^4 cells/ml from the seven breast cancer cell lines were seeded, and after 48 hours treated with 5'-aza-deoxycytidine (AZA), methotrexate (MTX) and 5-FU at a final concentration of 100 μ M, 50 μ M and 10 μ M, respectively.

These drugs were chosen due to their action as inhibitors of *de novo* AMP synthesis. Cell proliferation was measured after 72 hours of the treatment in a TECAN® Infinite 200 multimode microplate reader (TECAN Group Ltd., Switzerland), using the MTS assay (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium) following the manufacturer's description. These assays were repeated four times.

esiRNA transfection:

Double-strand esiRNA for *MTAP* and a non-specific scrambled siRNA were obtained commercially (Eupheria Biotech, Sigma). Fifty microliters of the *MTAP*-positive MDA-MB-435 cells were seeded in 96-wells culture vessel at 4.0×10^4 cells/ml the day before transfection. Cells were transfected with esiRNA duplexes or scrambled siRNA (45 nmol each) using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) reagents according to the vendor's protocol. *MTAP* expression was controlled by WB. Seventy-two hours after transfection, cells were treated for 72 hours with crescent concentrations of AZA, MTX and 5-FU. At the end of treatment, cells viability was accessed by MTS assay. These experiments were done in triplicates and repeated twice.

Statistical analysis:

RT-qPCR data were evaluated by the Shapiro-Wilk normality test, displaying a non-normal distribution. The Mann-Whitney U test was chosen to compare clinico-pathological and gene expression data between the groups (fresh tumors and non-compromised samples, TNBC and luminal-A tumors), and a linear regression test was chosen to correlate gene expression and patient's age and tumor size. Statistical analyses were carried out in Prism 5 version 5.04 (GraphPad Software Inc., USA). All tests were performed two-sided and p values <0.05 were considered statistically significant.

Results:

MTAP expression in breast cancer samples:

Fresh breast tumor samples were separated by histological subtypes, being IDC group the major one ($n= 35$). The expression of *MTAP* was 1.98 ± 1.05 and 1.32 ± 0.72 in non-compromised and IDC samples, respectively. The difference was not statistically significant (p value= 0.065) (Figure 1a). Non-significant differences were found between *MTAP* expression and the clinico-pathological features (Table 3). Using the regression coefficient test, no correlations were found between *MTAP* expression and variations in tumor size and age of diagnosis (p value= 0.059 and 0.951, respectively). Fresh breast tumor samples ($n= 46$) were further classified by the intrinsic subtypes, and no difference in *MTAP* expression was observed between Luminal-A ($n= 23$) and Luminal-B ($n= 14$) groups (1.43 ± 0.68 and 1.26 ± 0.6 , respectively, p value= 0.45) (Figure 1b). Due to the small number of samples in each intrinsic subtype group, other analyses were not performed.

In the group of core-biopsy samples, expression of *MTAP* mRNA in Luminal-A tumors ($n= 60$) was 384.5 ± 251.5 , and in TNBC ($n= 81$) was 237.7 ± 166.3 . The expression rate of *MTAP* is 1.62 times greater in Luminal-A than in TNBC, and this difference was statistically significant ($p < 0.0001$) (Figure 1c).

Cell lines characterization:

Expression of *CDKN2A* and *MTAP* mRNA at breast cancer cell lines varied from 0 to 4.46 and 0 to 1.00, respectively (Table 4). Cell line MDA-MB-435 was used as calibrator sample to the relative expression.

MS-PCR at breast cancer cell lines show that four of them were partially methylated (MDA-MB-435, MDA-MB 468, MCF-7 and T47-D), whereas cell lines MDA-MB-231 and ZR-75-I did not show any amplification for *MTAP* gene promoter (Table 4).

CDKN2A protein was readily detected in MDA-MB-435, MDA-MB-468 and SK-BR-3, while *MTAP* protein was clearly detected only in MDA-MB-435 and MDA-MB-468 cells, and at a much less extent in SK-BR-3 and T47-D cells (Figure 2a-b). *MTAP* expression obtained by WB was corroborated by IMF (data not shown). Cell

line MDA-MB-435 shown the strongest *MTAP* gene and protein expression signals by RT-qPCR, WB and IMF. Cell lines MDA-MB-468 and SK-BR-3 show intermediate gene and protein expression signals by the three approaches. Cell line T47-D shows a weak gene expression, and protein was difficult to observe by WB. The IMF analysis permitted to visualize MTAP protein at cell line T47-D. Cell lines MDA-MB-231, MCF-7 and ZR-75-I did not show gene or protein expression by WB, but the cells shown a weak protein signal by IMF.

Cytotoxicity experiments and esiRNA transfection:

Since breast cancer cell lines have different genetic backgrounds other than MTAP status, we did not observe clearly chemo-sensitivity differences between MTAP-positive and MTAP-negative cell lines (data not shown) after drug treatments. To clarify this analysis, cell line MDA-MB-435 was chosen to perform an esiRNA transfection against the *MTAP* gene, once these cells were clearly positive to MTAP expression at mRNA and protein levels. Then, esiRNA systems were used for the chemo-sensitivity experiments. The MTAP status influenced the chemo-sensitivity of cells to 5-FU. The mean of IC-50 for 5-FU treatment at MTAP-positive cells was $>10 \mu\text{M}$, while that at MTAP-negative cells was $5.24 \mu\text{M}$ (Figure 3a-c), indicating that 5-FU can selectively kill MTAP-negative tumor cells. We observed a slight difference in the viability of MTAP-positive and negative cells after AZA treatment, while the MTAP-negative cells were more sensitive. We did not observed an important difference of viability of MTAP-positive and negative cells after MTX treatment (mean of IC-50 for MTAP-positive cells= $>0.07 \mu\text{M}$, mean of IC-50 for MTAP-negative cells= $0.05 \mu\text{M}$).

Discussion:

Recently, Curtis and colleagues [19] highlighted a high frequency of *MTAP* deletions in an integrated analysis of copy number and gene expression, with two sets of almost a thousand primary breast tumors each. Nevertheless, there is a lack of information on *MTAP*-deficiency in primary breast cancer [4]. In a previous study [15] we found a high rate (90%) of concordant LOH between *CDKN2A* and *MTAP* genes in primary breast tumors, and hypothesized if the expression of *MTAP* was

decreased in our samples relative to non-compromised tissues or among the clinico-pathological parameters.

We assessed *MTAP* mRNA expression in a sample of IDC and non-compromised tissue samples, and the difference was not statistically significant (Figure 1a). Also, we did not find any correlation between *MTAP* expression and the clinico-pathological parameters (Table 3), probably because the small size of our sample. Miyazaki et al. [20], in a cohort of 40 osteosarcoma samples, found 27.5% of absence of MTAP protein expression and also no correlations with the clinico-pathological parameters. Our results are similar to the reported by Alhebshi et al. [21], for MTAP protein expression in 20 normal human skin tissue samples and 109 cutaneous squamous cell carcinomas, where no significant correlations with the clinico-pathological parameters were found. The small size of our sample and the contamination with normal cells after the macro-dissection of the fresh tumors may be responsible for the results obtained. In order to avoid this technical problem, we studied a second group obtained from core-biopsy, and found a significant higher expression of *MTAP* in Luminal-A tumors than in TNBC (Figure 1c). Christopher et al. [7] observed that the loss or reduction of MTAP expression in breast tumor cells is involved in the anchorage independent growth. This is important to the progression of the disease, permitting the spreading of the tumor and metastasis, characteristics that are commonly observed in more aggressive cancers, like TNBC. Crespo et al. [22] pointed out the potential relevance of *MTAP* as a tumor suppressor in glioblastomas, since it was the single homozygously deleted gene at chromosome 9p21 (from 11 genes analyzed at this region) for which they found a high correlation between copy number values and mRNA expression levels. However, Dou et al. [23] observed an inverse correlation between cells differentiation and *MTAP* relative expression in colorectal cancer, mainly due to the promoter demethylation in more malignant tumors.

It is known that *MTAP* loss can be associated or not with *CDKN2A* loss, and promoter hypermethylation has been described as an alternative mechanism to the loss of expression [24]. Here, we characterized seven breast cancer cell lines to mRNA and protein expression of *MTAP* and *CDKN2A* genes (Figure 2, Table 4). MCF-7 and MDA-MB-231 cells were already known to be *MTAP*-deficient [4]. Accordingly to our results, cell lines MDA-MB-231 and ZR-75-I harbor a co-deletion of *MTAP* and *CDKN2A* genes, since they show no amplification by RT-qPCR and

MS-PCR, as well as no protein expression. Bisogna et al. [25] described not a deletion at *CDKN2A* gene in ZR-75-I cells, but its promoter methylation. In our study, MCF-7 cells shown no expression of *CDKN2A* and *MTAP*, however *MTAP* promoter was partially methylated. Bisogna et al. [25] also described a deletion of *CDKN2A* in this cell line, but not of *CDKN2B* or *INK4A* genes, that are closely located in the chromosome. Maybe this is not a case of co-deletion, and *MTAP* is not expressed in MCF-7 cells due to DNA methylation. The other cell lines studied were positive to *CDKN2A* and *MTAP* expression. T47-D cells show strong *CDKN2A* mRNA expression but not evident protein expression by WB. This could be a technical problem or there is some kind of post-transcriptional alteration involved, like interference RNA. Bisogna et al. [25] observed a strong DNA methylation at *CDKN2A* promoter in this cell line, which explain the protein absence in our study, but not the mRNA presence. Kim et al. [3] analyzed a set of gastric cancer cell lines and found a correlation between mRNA down-regulation and homozygous deletion of *MTAP* and *CKN2A*, once 8 of 10 cell lines expressed both genes, but the proteins were absent in two out of ten cell lines with a homozygous deletion.

We find that MTAP-negative tumor cells are more sensitive to purine inhibitors than MTAP-positive tumor cells (Figure 3a-c). Hellerbrand et al. [26] show a down-regulation of *MTAP* in 15 hepatocellular carcinoma (HCC) samples. In a posterior study [27], it was demonstrated that enhanced MTA levels in HCC can be involved in HCC progression and were caused by down-regulation of *MTAP*. Myiazaki et al. [20] proposed that the MTAP enzyme deficiency observed in osteosarcomas was caused by genetic and epigenetic mechanisms, and that MTAP deficiency could be exploited for selective chemotherapy with inhibitors of *de novo* polyamine synthesis. Zimling, Jorgensen and Santoni-Rugiu [28], studying MTAP immunoreactivity in 99 malignant pleural mesotheliomas (MPMs), found that 65% of the tumors analyzed had a decreased reactivity to MTAP. They proposed that this decreased MTAP expression, in combination with other common markers, could be a potential diagnostic marker. As to MPMs, the decreased expression of *MTAP* in TNBC could be useful as a diagnostic and therapeutic marker.

Until now, three different approaches based on MTAP status have been proposed. In 1981, Katamani et al. [29] suggested the use of inhibitors of *de novo* purine synthesis (MTX, azaserine, 5,10-dideazotetrahydrofolate, L-alanosine) and the enzyme substrate MTA to selectively kill MTAP-negative cells. In 1983, Tisdale [11]

proposed a therapy based on the administration of a methioninase, which could deplete methionine of the serum. Normal cells can be rescued by providing MTA, cleaved to MTR-1-P and leading to methionine synthesis, but not the MTAP-negative tumor cells. None of these strategies had clinical success [30]. More recently, Lubin and colleagues [4,13] developed an approach based on the use of a toxic purine or pyrimidine analogs (DAP, MeP, F-Ade, 5-FU, 6-TG) and the enzyme substrate (MTA or 5'-dAdo) to protect normal cells. In our study TNBC express significantly less *MTAP* than more differentiated Luminal-A breast tumors (Figure 1c), which may open the possibility of this new approach to TNBC patients.

Our data from esiRNA approach support Lubin and Lubin [13] proposed therapy, once they show a significantly higher sensitivity of MTAP-negative cells to 5-FU (Figure 3a). Antimetabolites, like 5-FU, kill both malignant and normal proliferating cells, exhibiting a high toxicity to the patient. The therapeutic index (ratio of the highest exposure to the drug that results in no toxicity to the exposure that produces the desired efficacy) for them is too low to be effective in treating the vast majority of the tumors [14]. An increased therapeutic index is observed treating MTAP-negative tumors with anti-purine-based chemotherapy in addition of MTA, which efficiently protects the normal cell [4,13-14,31].

Breast cancer patients with high-grade tumors tend to be TNBC or ERBB2+ subtypes, receiving a higher chemotherapy rate and presenting a higher breast cancer death rate [32]. The broad recommendations of the St. Gallen Consensus [16] indicate endocrine therapy alone for Luminal-A patients, chemotherapy and endocrine therapy for Luminal-B patients, an addition of anti-ERBB2 (trastuzumab) therapy in cases of ERBB2+ and just the chemotherapy treatment for TNBC patients.

There is a need for new predictive biomarkers in breast cancer, especially for more aggressive tumors, such as TNBC. One might expect the need to develop new less toxic drugs and targeted therapies for this class of patients. *MTAP* loss of expression in TNBC, and the use of toxic purine or pyrimidine analogs and MTA, may offer a relevant strategy in this field.

Conclusions:

This study performed *MTAP* expression analyses in breast cancer patients and cell lines, and examined the relationship between *MTAP* expression and chemo-

sensitivity to inhibitors of AMP synthesis. We found *MTAP* being significantly less expressed in TNBC than in Luminal-A breast tumors. We have also observed that after esiRNA transfection, *MTAP*-negative cells were significantly more sensitive to 5-FU. TNBC can be benefited with the use of anti-polyamine-based chemotherapy in addition of MTA in cases of proven *MTAP* negativity, once higher doses of the drug can be administrated without damages to the non-compromised cells. It is important to emphasize the need of new studies, with larger samples, to prove the relevance of *MTAP*-negativity in TNBC, and the potential of anti-polyamine-based treatment to these patients.

Acknowledgements:

This research was partially supported by a research grant from CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), and a scholarship from CAPES-PSDE (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior), case number 4623/11-8.

Ethical standards:

The experiments comply with the current laws of Brazil and Italy.

Conflict of interest:

The authors declare that they have no conflict of interest.

References:

1. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D (2011) Global Cancer Statistics. *Cancer J Clin* 61:69-90.
2. INCA - Instituto Nacional do Cancer (2012) Estimativa de câncer 2012. <http://www1.inca.gov.br/estimativa/2012/>. Accessed 26 June 2013
3. Kim J, Kim MA, Min SY, Jee CD, Lee HE, Kim WH (2011) Down-regulation of Methylthioadenosine Phosphorylase by Homozygous Deletion in Gastric Carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer* 50:421-433.
4. Bertino JR, Waud WR, Parker WB, Lubin M (2011) Targeting tumors that lack methylthioadenosine phosphorylase (MTAP) activity: Current strategies. *Cancer Biol Ther* 11:627-632.
5. Schmid M, Malicki D, Nobori T, Rosenbach MD, Campbell K, Carson DA, Carrera CJ (1998) Homozygous deletions of methylthioadenosine phosphorylase (MTAP) are more frequent than p16INK4A (CDKN2) homozygous deletions in primary non-small cell lung cancers (NSCLC).

- Oncogene 17:2669-2675.
6. M'soka TJ, Nishioka J, Taga A, Kato K, Kawasaki H, Yamada Y, Yu A, Komada Y, Nobori T (2000) Detection of methylthioadenosine phosphorylase (MTAP) and p16 gene deletion in T cell acute lymphoblastic leukemia by real-time quantitative PCR assay. *Leukemia* 5:935-940.
 7. Christopher SA, Diegelman P, Porter CW, Kruger WD (2002) Methylthioadenosine Phosphorylase, a Gene Frequently Codeleted with p16cdkN2a/ARF, Acts as a Tumor Suppressor in a Breast Cancer Cell Line. *Cancer Res* 62:6639-6644.
 8. Illei PB, Rusch VW, Zakowski MF, Ladanyi M (2003) Homozygous Deletion of CDKN2A and Codeletion of the Methylthioadenosine Phosphorylase Gene in the Majority of Pleural Mesotheliomas. *Clin Cancer Res* 9:2108–2113.
 9. Hustinx SR, Leoni LM, Yeo CJ, Brown PN, Goggins M, Kern SE, Hruban RH, Maitra A (2005) Concordant loss of MTAP and p16/CDKN2A expression in pancreatic intraepithelial neoplasia: evidence of homozygous deletion in a noninvasive precursor lesion. *Modern Pathol* 18:959–963.
 10. Chen ZH, Olopade OI, Savarese TM (1997) Expression of methylthioadenosine phosphorylase cDNA in p16-, MTAP-malignant cells: restoration of methylthioadenosine phosphorylase-dependent salvage pathways and alterations of sensitivity to inhibitors of purine de novo synthesis. *Mol Pharmacol* 52:903-911.
 11. Tisdale MJ (1983) Methionine synthesis from 5'-methylthioadenosine by tumour cells. *Biochem Pharmacol* 32:2915-2920.
 12. Kadariya Y, Tang B, Myers CB, Fukui J, Peterson JR, Kruger WD (2011) Chemical Genetic Screening for Compounds that Preferentially Inhibit Growth of Methylthioadenosine Phosphorylase (MTAP) Deficient *Saccharomyces Cerevisiae*. *J Biomol Screen* 1:44–52.
 13. Lubin M, Lubin A (2009) Selective Killing of Tumors Deficient in Methylthioadenosine Phosphorylase: A Novel Strategy. *PLoS ONE* 5:e5735.
 14. Tang B, Testa JR, Kruger WD (2012) Increasing the therapeutic index of 5-fluorouracil and 6-thioguanine by targeting loss of MTAP in tumor cells. *Cancer Biol Ther* 13:1082-1089.
 15. de Oliveira SFV, Oliveira MMC, Urban CA, de Lima RS, Cavalli IJ, Ribeiro EMSF (2010) Lack of association between LOH in the 9p region and clinicopathologic parameters in primary breast cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 200:23-27.
 16. Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, Gelber RD, Thurlimann B, Seen HJ, panel members (2011) Strategies for subtypes—dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. *Ann Oncol* 22:1736-1747.
 17. Cheang MCU, Voduc D, Bajdik C, Leung S, McKinney S, Chia SK, Perou CM, Nielsen TO (2008) Basal-Like Breast Cancer Defined by Five Biomarkers Has Superior Prognostic Value than Triple-Negative Phenotype. *Clin Cancer Res* 14:1368-1376.
 18. Lin C, Chien SY, Chen LS, Kuo SJ, Chang TW, Chen DR (2009) Triple negative breast carcinoma is a prognostic factor in Taiwanese women. *BMC Cancer* 9:192.
 19. Curtis C, Shah SP, Chin SF, Turashvili G, Rueda OM, Dunning MJ, Speed D, Lynch AG, Samarajiwa S, Yuan Y, Gra S, Ha G, Haffari G, Bashashati A, Russell R, McKinney S, METABRIC Group, Langerød A, Green A,

- Provenzano E, Wishart G, Pinder S, Watson P, Markowitz F, Murphy L, Ellis I, Purushotham A, Børresen-Dale AL, Brenton JD, Tavare S, Caldas C, Aparicio S (2012) The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups. *Nature* 486:346-352.
20. Miyazaki S, Nishioka J, Shiraishi T, Matsumine A, Uchida A, Nobori T (2007) Methylthioadenosine phosphorylase deficiency in Japanese osteosarcoma patients. *Int J Oncol* 31:1069-1076.
 21. Alhebshi HM, Pant I, Kaur G, Hashim H, Mabruk MJEMF (2008) Methylthioadenosine Phosphorylase Expression in Cutaneous Squamous Cell Carcinoma. *Asian Pacific J Cancer Prev* 9:291-294.
 22. Crespo I, Tao H, Nieto AB, Rebelo O, Domingues P, Vital AL, Patino MC, Barbosa M, Lopes MC, Oliveira CR, Orfao A, Tabernero MD (2012) Amplified and Homozygously Deleted Genes in Glioblastoma: Impact on Gene Expression Levels. *PLoS ONE* 7:e46088.
 23. Dou JX, Zhang WD, Li WT, Li HL, Cai XS, Liu J (2009) Expression of methylthioadenosine phosphorylase (MTAP) gene and demethylation of its promoter in human colorectal cancer. *Ai Zheng* 28:390-394.
 24. Conde L, Vilaseca I, Alos L, Bernal-Sprekelsen M, Cardesa A, Nadal A (2012) Methylthioadenosine phosphorylase inactivation depends on gene deletion in laryngeal squamous cell carcinoma. *Histopathology* 61:1082–1088.
 25. Bisogna M, Calvano JE, Ho GH, Orlow I, Córdón-Cardó C, Borgen PI, Van Zee KJ (2001) Molecular analysis of the INK4A and INK4B gene loci in human breast cancer cell lines and primary carcinomas. *Cancer Genet Cytogenet* 125:131–138.
 26. Hellerbrand C, Muhlbauer M, Wallner S, Schuierer M, Behrmann I, Bataille F, Weiss T, Scholmerich J, Bosserhoff AK (2006) Promoter-hypermethylation is causing functional relevant down-regulation of methylthioadenosine phosphorylase (MTAP) expression in hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis* 27:64–72.
 27. Kirovski G, Stevens AP, Czech B, Dettmer K, Weiss TS, Wild P, Hartmann A, Bosserhoff AJ, Oefner PJ, Hellerbrand C (2011) Down-Regulation of Methylthioadenosine Phosphorylase (MTAP) Induces Progression of Hepatocellular Carcinoma via Accumulation of 5-Deoxy-5-Methylthioadenosine (MTA). *Am J Pathol* 178:1145-1152.
 28. Zimling ZG, Jørgensen A, Santoni-Rugiu E (2012) The diagnostic value of immunohistochemically detected methylthioadenosine phosphorylase deficiency in malignant pleural mesotheliomas. *Histopathology* 60:96–105.
 29. Kamatani N, Nelson-Rees WA, Carson DA (1981) Selective killing of human malignant cell lines deficient in methylthioadenosine phosphorylase, a purine metabolic enzyme. *Proc Natl Acad Sci* 78:1219–1223.
 30. Kindler HL, Burris III HA, Sandler AB, Oliff IA (2009) A phase II multicenter study of L-alanosine, a potent inhibitor of adenine biosynthesis, in patients with MTAP-deficient cancer. *Invest New Drugs* 27:75–81.
 31. Bertino JR, Lubin M, Johnson-Farley N, Chan WC, Goodell L, Bhagavathi S (2012) Lack of Expression of MTAP in Uncommon T-Cell Lymphomas. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 12:306-309.
 32. Chen ST, Lai HW, Tseng HS, Chen LS, Kuo SJ, Chen DR (2011) Correlation of Histologic Grade With Other Clinicopathological Parameters, Intrinsic Subtype, and Patients' Clinical Outcome in Taiwanese Women. *Jpn J Clin Oncol* 41:1327–1335.

Figure 1 – Scatter-plot graphics of *MTAP* expression in breast cancer samples.

(a) IDC (●) and non-compromised samples (x). Black line represents the median value. T, IDC tumors; NT, non-compromised samples; (number of samples). (b) Luminal-A (●) and Luminal-B (x). fresh samples (c) Luminal-A (●) and TNBC (x) core-biopsy samples.

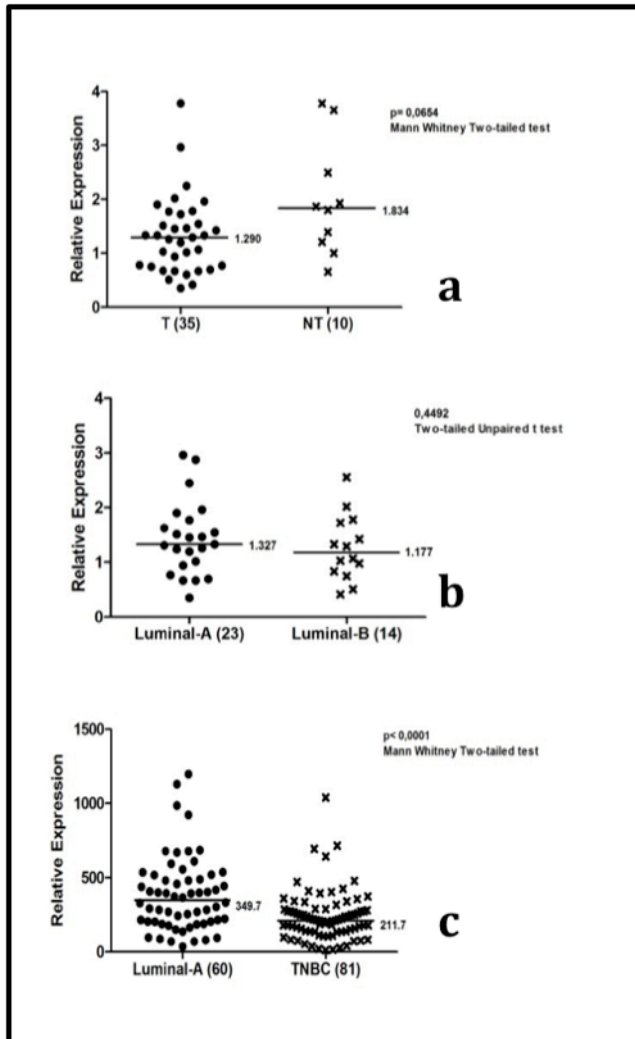


Figure 2 – WB at breast cancer cell lines.

(a) CDKN2A WB. (b) MTAP WB. β -tubulin protein, 55 kDA; CDKN2A protein, 16 kDA; MTAP protein, 31 kDA. The MTAP WB analyses were done in nitrocellulose (first line) and PVDF (second line) membranes (not for SK-BR-3).

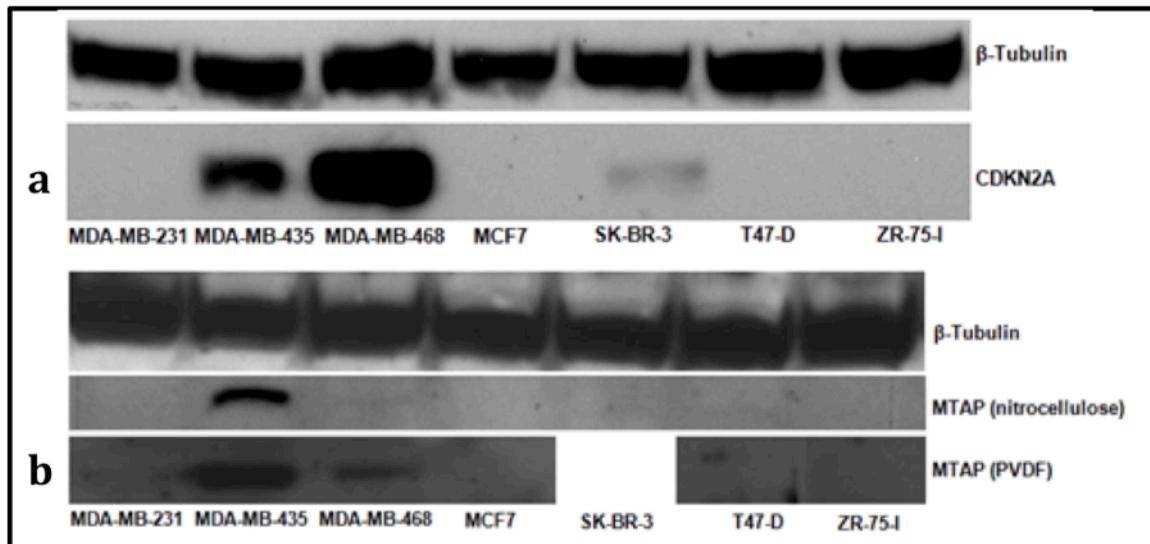


Figure 3 - MTAP inactivation by esiRNA transfection and cell viability after purine inhibitors treatments.

(a) Inhibition of MTAP- cell viability by 5-FU. MTAP+ and MTAP- cells were exposed to 5-FU concentrations ranging from 0-10 μ M. Cell viability was assessed using an MTS assay, and all results are given as percentual. (b) Same as (a) except MTX doses ranging from 0-0.1 μ M were used instead of 5-FU. (c) Same as (a) except AZA doses ranging from 0-100 μ M were used instead of MTX.

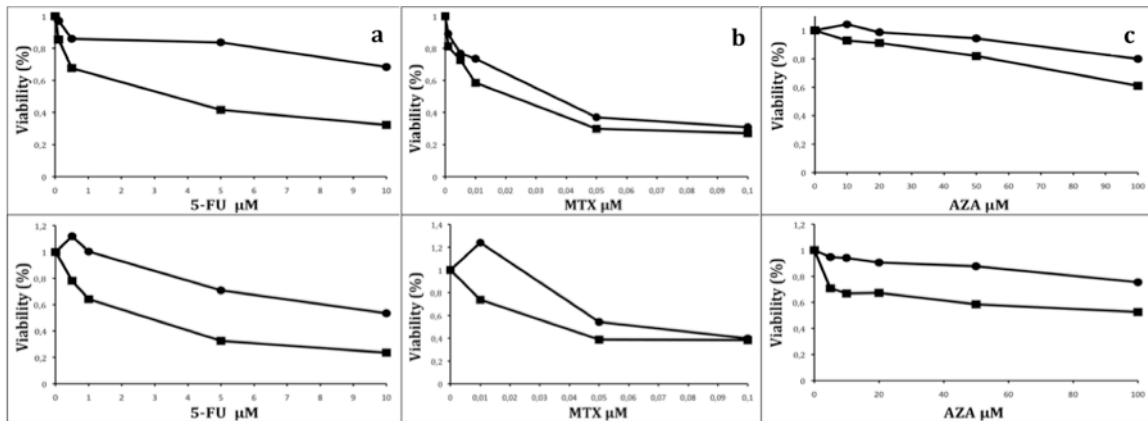


Table 1 - Clinico-pathological information of primary breast cancer samples.

IDC, invasive ductal carcinoma; ILC, invasive lobular carcinoma; *, mucinous carcinoma, tubular-lobular carcinoma, pleomorphic carcinoma; TNBC, triple negative breast cancer; mm, millimeters.

Subtypes	Number of patients	%
IDC	36	78.26
ILC	3	6.52
Mixed	4	8.70
Others*	3	6.52
<i>Intrinsic Subtypes</i>		
Luminal-A	23	54.80
Luminal-B	14	33.30
ERBB2 +	2	4.80
TNBC	3	7.14
Not-informed	4	
<i>Lymph node metastasis</i>		
Present	21	48.84
Absent	22	51.16
Not-informed	3	
<i>Tumor grade</i>		
I	6	13.64
II	28	63.64
III	10	22.72
Not-informed	2	
<i>Tumor size</i>		
≤ 20 mm	20	45.45
> 20 mm	24	54.55
Not-informed	02	
<i>Estrogen receptor (ER)</i>		
Positive	37	84.09
Negative	7	15.91
Not-informed	2	
<i>Progesterone receptor (PR)</i>		
Positive	38	86.36
Negative	6	13.64
Not-informed	2	
<i>ERBB2 amplification</i>		
Positive	9	21.43
Negative	33	78.57
Not-informed	4	

Table 2 – RT-qPCR and MS-PCR primers.

Primers sequences are in the sense 5'- 3'. m, methylated; u, unmethylated.

Gene	Forward	Reverse
<i>RT-qPCR</i>		
ACTB	GATGCAGAAGGAGATCACTGC	AGTACTTGCGCTCAGGAGGA
B2M	TGACTTTGTCACAGCCCAAGATA	CGGCATCTTCAAACCTCCA
MTAP	CCACCGCCGTGAAGATTGGAA	CCACCGCCGTGAAGATTGGAA
CDKN2A	CCACCGCCGTGAAGATTGGAA	AAGTTTCCCGAGGTTTCTCA
<i>MS-PCR</i>		
MTAP m	TGTTTTTTTAGGAATTAAGGGAAATAC	AACTACAAAATCTAACCCGACGAC
MTAP u	TTTTTAGGAATTAAGGGAAATATGT	CAACTACAAAATCTAACCCAACAAC

Table 3 - Clinico-pathological data of IDC and *MTAP* expression. mRNA *MTAP* expression data are mean \pm standard deviation; (number of patients). Pos, positive clinicopathological status; Neg, negative clinicopathological status; *p*, probability-value from Mann Whitney Test; ER, estrogen receptor; PR, progesterone receptor.

	Lymph node metastasis	ER status	PR status	ERBB2 status		Tumor grade
Pos	1.28 \pm 0.62 (19)	1.27 \pm 0.60 (27)	1.30 \pm 0.59 (27)	1.10 \pm 0.48 (6)	I/II	1.33 \pm 0.77 (25)
Neg	1.37 \pm 0.83 (16)	1.72 \pm 1.15 (6)	1.59 \pm 1.23 (6)	1.32 \pm 0.62 (26)	III	1.29 \pm 0.60 (10)
<i>p</i>	0.094	0.498	0.981	0.454	<i>p</i>	0.927

Table 4 – Cell lines characterization.

RT-qPCR, quantitative Real-Time PCR (relative data); WB, western-blotting; IMF, immunofluorescence; MS-PCR, methylation specific PCR; -, not-expressed/not-amplified; +, ++, +++, level of expression; X, not-performed; M/U, methylated/unmethylated.

	RT-qPCR CDKN2A	RT-qPCR MTAP	WB CDKN2A	WB MTAP	IMF MTAP	MS-PCR MTAP
MDA-MB-231	0.00	0.00	-	-	+	-
ZR-75-1	0.00	0.00	-	-	+	-
MCF-7	0.00	0.00	-	-	X	M/U
MDA-MB-435	1.00	1.00	++	+++	+++	M/U
MDA-MB-468	1.49	0.46	+++	++	++	M/U
SK-BR-3	0.57	0.42	+	+	++	X
T47-D	4.46	0.19	-	+	+++	M/U

6 DISCUSSÃO

A análise da expressão de genes envolvidos nas vias de reparo do DNA apresenta uma importante relevância clínica, pois sugere os mecanismos envolvidos na carcinogênese, na resposta ao tratamento farmacológico e também contribui para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas (ALTIERI *et al.*, 2008). A análise da expressão de outros genes que fazem parte de vias importantes do metabolismo celular, como a via da biossíntese de purinas, é crucial para o desenvolvimento de novos fármacos ou de esquemas terapêuticos mais eficientes para determinados tipos tumorais.

Foi investigada a expressão de mRNA de seis genes (*FANCA*, *-C*, *-D2*, *-F*, *BRCA1* e *PALB2*) que atuam na via de reparo do DNA *FA-BRCA*, em um grupo de tumores de mama esporádicos e de tecido não-tumoral da mama contralateral. Também foram feitas correlações com os subtipos intrínsecos e os parâmetros histopatológicos do câncer de mama. O gene *FANCD2* apresentou-se super-expresso no grupo de tumores IDC em relação ao grupo não-tumoral, e o gene *BRCA1* apresentou menor expressão no subgrupo Luminal-B em relação ao Luminal-A.

Os resultados observados têm relevância científica em relação aos mecanismos envolvidos na oncogênese mamária. Ozawa *et al.* (2010), Kao *et al.* (2011) e Ganzinelli *et al.* (2011) observaram o aumento da expressão de genes da via *FA-BRCA* (incluindo *FANCD2*) em carcinomas colorretais, melanomas e carcinomas de ovário, respectivamente. A ativação desta via de reparo do DNA contribui para a carcinogênese nestes tipos tumorais, e segundo Kee e D'Andrea (2010), a formação do complexo *FANCD2-FANCI* é um marcador estabelecido de ativação da via. Uma vez ativa, a via *FA-BRCA* confere um aumento na resistência aos danos endógenos no DNA, observados nos estados oncogênicos (NITTA *et al.*, 2010), e também a agentes que causam danos, como a ciclofosfamida (CHEN *et al.*, 2007).

A maior parte dos esquemas terapêuticos adjuvantes aos quais as pacientes analisadas foram submetidas apresentam ciclofosfamida como um dos fármacos utilizados. É importante avaliar a expressão de genes como *FANCD2* em pacientes com recidivas locais ou sistêmicas, uma vez que este gene se mostrou mais

expresso nas amostras de tumores IDC em relação ao grupo não-tumoral, e o aumento da sua expressão já foi correlacionado com a resistência à ciclofosfamida e outros quimioterápicos (CHEN, TANIGUCHI e D'ANDREA, 2007).

Em relação ao gene *BRCA1*, Ganzinelli *et al.* (2011) e Ribeiro *et al.* (2013) observaram a diminuição da sua expressão em pacientes com carcinomas avançados (de pior prognóstico) de ovário e de mama, respectivamente; sugerindo que a diminuição da expressão do gene em tumores mais agressivos pode ser responsável pelo aumento da instabilidade genômica.

A análise da expressão dos genes envolvidos na via *FA-BRCA* também apresenta uma forte relevância clínica, pois pode influenciar a resposta a diversos fármacos, e também servir como alvos terapêuticos. A expressão de *BRCA1* pode ser explorada no tratamento de tumores mamários esporádicos com diferentes classes de fármacos. Nossos resultados apresentam a diminuição da expressão de *BRCA1* nos tumores do subtipo Luminal-B, corroborando os estudos de Van der Groep *et al.* (2008), Byrski *et al.* (2009, 2010) e Gao *et al.* (2013), que sugerem que a perda de expressão de *BRCA1* é um indicador para o tratamento baseado em cisplatina; e que tratamentos baseados em taxanos, como docetaxel e paclitaxel, devem ser evitados, por aumento do risco de resistência. O uso de inibidores da enzima PARP1 também constitui uma estratégia terapêutica relevante nestes casos. Alan & D'Andrea (2010) demonstraram que tumores com mutações nos genes *BRCA1/2* são mais dependentes da via de reparo BER, e que PARP1 é uma enzima crítica neste processo. Com a inibição de PARP1 e consequentemente desta via alternativa, provoca-se a morte celular, fenômeno conhecido como letalidade sintética.

O subtipo Luminal-B é associado a um maior risco de recorrência e a uma menor taxa de sobrevida livre de doença (CHEANG *et al.*, 2009), além de apresentar maior resistência ao tamoxifeno, demonstrando beneficiar-se mais do tratamento quimioterápico associado a antiestrogênicos (inibidores de aromatase) do que o subtipo Luminal-A (KENNECKE *et al.*, 2010). Ribeiro *et al.* (*in press*) observaram diminuição da expressão de *BRCA1* em TNBC em relação a tumores Luminal-A. Nesta amostra, somente os grupos Luminal-A e Luminal-B puderam ser testados devido ao tamanho amostral, porém a redução da expressão de *BRCA1* no grupo Luminal-B em relação ao Luminal-A observada corrobora a relevância deste gene na carcinogênese mamária esporádica, e indica a perda da expressão do gene mais

precocemente durante o desenvolvimento tumoral. Em relação à adjuvância das pacientes do tipo Luminal-B analisadas neste trabalho, nenhuma delas recebeu tratamento baseado em cisplatina (tratamento sugerido para pacientes com perda da expressão de *BRCA1*), quatro receberam paclitaxel no esquema AC x 4 => P x 12, e uma foi tratada com docetaxel no esquema TC x 4=>IA (esquemas com taxóis). Infelizmente, não tivemos acesso às informações de sobrevida livre de doença ou sobrevida global das pacientes.

No grupo de tumores esporádicos da mama e de tecido não-tumoral da mama contralateral foi investigada a expressão de *MTAP*, que não apresentou diferenças entre os dois grupos. Entretanto, na análise subsequente de um segundo grupo amostral de tumores de mama provenientes de *core-biopsy*, *MTAP* apresentou uma diminuição da expressão nos tumores TNBC em relação aos tumores Luminal-A. Foi realizada a inativação de *MTAP* em uma linhagem de carcinoma mamário positiva para este gene, e foi observada uma maior sensibilidade das células com inativação de *MTAP* aos fármacos que interferem na biossíntese de poliaminas, sendo os melhores resultados com 5'-FU.

Christopher *et al.* (2002) observaram que a perda ou redução da expressão de *MTAP* nas células tumorais da mama está envolvida com o crescimento independente de ancoragem, passo importante para a progressão da doença para um estado mais agressivo (como o observado em TNBC). Diversos autores atribuem uma função de supressão tumoral ao gene *MTAP* (ISHII *et al.*, 2005; MARCÉ *et al.*, 2006; CRESPO *et al.*, 2012), já que ele é expresso em todos os tecidos normais e em muitos casos é perdido ou apresenta a expressão reduzida em tumores.

Tumores que perdem ou apresentam expressão reduzida de *MTAP* são mais sensíveis a inibidores da síntese de poliaminas (MYIAZAKI *et al.*, 2007; LUBIN & LUBIN, 2009), como a 5'-FU. Bertino *et al.* (2011) propuseram um esquema terapêutico para pacientes com tumores *MTAP*-negativos, baseado no uso de um análogo de purinas, como a 5'-FU, e do substrato da enzima, MTA, que protege as células não-tumorais (*MTAP*-positivas) dos efeitos tóxicos do fármaco, aumentando o índice terapêutico e a regressão tumoral.

Apesar de apresentar boa resposta inicial à quimioterapia, o subtipo TNBC apresenta pior prognóstico devido à ausência de terapia adjuvante específica, portanto é essencial identificar os melhores alvos terapêuticos para estas pacientes (PEROU, 2011). A menor expressão de *MTAP* observada nestes tumores torna este

gene um alvo molecular relevante, indicando que estas pacientes possam apresentar benefícios com o uso de análogos de purinas em associação com MTA, conforme proposto por Lubin e colaboradores (LUBIN e LUBIN, 2009; BERTINO *et al.*, 2011)

7 CONCLUSÃO

O gene *FANCD2* apresentou expressão aumentada no grupo IDC em relação ao grupo não-tumoral. O aumento da expressão de *FANCD2* nos tumores pode levar a uma maior resistência das pacientes à terapia baseada em fármacos como a ciclofosfamida. O gene *BRCA1* apresentou menor expressão no subgrupo Luminal-B em relação ao Luminal-A, corroborando a relevância deste gene na carcinogênese mamária. A perda da expressão de *BRCA1* é um indicador para o tratamento adjuvante baseado em cisplatina; e para que tratamentos baseados em taxanos sejam evitados, pelo risco aumentado de resistência. O gene *BRCA1* apresentou maior expressão nos tumores PR-positivos em relação aos tumores PR-negativos.

O gene *MTAP* não apresentou variação de expressão entre os grupos IDC e não-tumoral, e não foram observadas correlações com os parâmetros clínico-patológicos. Entretanto, *MTAP* apresentou menor expressão nas amostras parafinizadas de TNBC em relação aos tumores Luminal-A. Com base nos resultados de expressão gênica e protéica e da análise de metilação no promotor do gene, observamos que as linhagens MDA-MB-231 e ZR-75-I apresentaram co-deleção de *MTAP* com o gene *CDKN2A*, a linhagem MCF-7 apresentou ausência da expressão de *MTAP*, provavelmente por metilação no promotor. As outras linhagens (MDA-MB-435, MDA-MB-468 e T47-D) foram positivas para a expressão do gene e proteína. As sete linhagens foram tratadas com diferentes concentrações de 5-FU, MTX e AZA, porém não foram observadas diferenças claras quanto à sensibilidade aos fármacos. As células *MTAP*-positivas MDA-MB-435 foram selecionadas para a inativação do gene por siRNA, e foi observada uma maior sensibilidade das células inativadas ao fármaco 5'-FU. A identificação do nível de expressão de *MTAP* pode ser um alvo relevante no tratamento de TNBC, pois estas pacientes podem apresentar benefícios com o uso de análogos de purinas em associação com MTA.

REFERÊNCIAS

ADAIR, F.; BERG, J.; JOUBERT, L.; ROBBINS, G.F. Long term follow-up of breast cancer patients: the 30 years report. **Cancer**, v. 33, p. 1145-1150, 1974.

ALAN, D.; D'ANDREA, M.D. The Fanconi Anemia and Breast Cancer. Susceptibility Pathways. **New England Journal of Medicine**, v. 362, p. 1909–1919, 2010.

ALMEIDA, V.L.; LEITÃO, A.; REINA, L.C.B.; MONTANARI, C.A.; DONNICI, C.L.; LOPES, M.T.P. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 118-129, 2005.

ALTIERI, F.; GRILLO, C.; MACERONI, M.; CHICHIARELLI, S. DNA Damage and Repair: From Molecular Mechanisms to Health Implications. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 10, n. 5, p. 891-937, 2008.

ALVAREZ, R.H. Present and future evolution of advanced breast cancer therapy. **Breast Cancer Research**, v.12 (Supplementary 2):S1, 2010.

BARROSO, E.; MILNE, R.L.; FERNÁNDEZ, L.P.; ZAMORA, P.; ARIAS, J.I.; BEÑÍTEZ, J.; RIBAS, G. FANCD2 associated with sporadic breast cancer risk. **Carcinogenesis**, v. 27, n. 9, p. 1930–1937, 2006.

BARROSO, E.; PITA, G.; ARIAS, J.I.; MENENDEZ, P.; ZAMORA, P.; BLANCO, M.; BENITEZ, J.; RIBASWANG, G. The Fanconi anemia family of genes and its correlation with breast cancer susceptibility and breast cancer features. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 118, p. 655–660, 2009.

BAUMANN, P.; BENSON, F.E.; WEST, S.C. Human Rad51 protein promotes ATP-dependent homologous pairing and strand transfer reactions in vitro. **Cell**, v. 87, p. 757–766, 1996.

BERRY, D.A.; CRONIN, K.A.; PLEVITIS, S.K.; FRYBACK, D.G.; CLARKE, L.; ZELEN, M.; MANDELBLATT, J.S.; YAKOVLEV, A.Y.; HABBEMA, J.D.; FEUER, E.J.; Cancer Intervention and Surveillance Modeling Network (CISNET) Collaborators. Effect of screening and adjuvant therapy on mortality from breast cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 353, n. 17, p. 1784-1792, 2005.

BERTINO, J.R.; WAUD, W.R.; PARKER, W.B.; LUBIN, M. Targeting tumors that lack methylthioadenosine phosphorylase (MTAP) activity: Current strategies. **Cancer Biology & Therapy**, v. 11, n. 7, p. 627-632, 2011.

BROWN, R.W.; ALLRED, D.C.; CLARK, G.M.; OSBORNE, C.K.; HILSENBECK, S.G. Prognostic value of Ki67 compared to S phase fraction in axillary node-negative breast cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 2, p. 585–592, 1996.

BRYANT, H.E.; SCHULTZ, N.; THOMAS, H.D.; PARKER, K.M.; FLOWER, D.; LOPEZ, E.; KYLE, S.; MEUTH, M.; CURTIN, N.J.; HELLEDAY, T. Specific killing of BRCA2- deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. **Nature**, v. 434, p. 913–917, 2005.

BITRAGO, F.; UEMURA, G.; FERREIRA SENA, M.C. Fatores prognósticos em câncer de mama. **Comunicação em Ciências da Saúde**, v. 22, p. 69-82, 2011.

BURSTEIN, H.; PRESTRUD, A.; SEIDENFELD, J.; ANDERSON, H.; BUCHHOLZ, T.; DAVIDSON, N.; GELMON, K.; GIORDANO, S.; HUDIS, C.; MALIN, J.; MAMOUNAS, E.; ROWDEN, D.; SOLKY, A.; SOWERS, M.; STEARNS, V.; WINER, E.; SOMERFIELD, M.; GRIGGS, J. American Society of Clinical Oncology Clinical Practice guideline: update on adjuvant endocrine therapy for women with hormone receptor-positive breast cancer. **J Clin Oncol**, v. 28, p. 3784–3796, 2010.

BUSTIN, S.A.; BENES, V.; GARSON, J.A.; HELLEMANS, J.; HUGGETT, J.; KUBISTA, M.; MUELLER, R.; NOLAN, T.; PFAFFL, M.W.; SHIPLEY, G.L.; VANDESOMPELE, J.; WITTEWER, C.T. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. **Clinical Chemistry**, v. 55, n. 4, p. 611–622, 2009.

BYAR, D.P.; SEARS, M.E.; MCGUIRE, W.L. Relationship between estrogen receptor values and clinical data in predicting the response to endocrine therapy for patients with advanced breast cancer. **European Journal of Cancer**, v. 15, p. 299–310, 1979.

BYRSKI, T.; GRONWALD, J.; HUZARSKI, T.; GRZYBOWSKA, E.; BUDRYK, M.; STAWICKA, M.; MIERZWA, T.; SZWIEC, M.; WISNIOWSKI, R.; SIOLEK, M.; DENT, R.; LUBINSKI, J.; NAROD, S. Pathologic complete response rates in young women with BRCA1-positive breast cancers after neoadjuvant chemotherapy. **Journal of Clinical Oncology**, v. 28, p. 375–379, 2010.

BYRSKI, T.; HUZARSKI, T.; DENT, R.; GRONWALD, J.; ZUZIAK, D.; CYBULSKI, C.; KLADNY, J.; GORSKI, B.; LUBINSKI, J.; NAROD, S.A. Response to neoadjuvant

therapy with cisplatin in BRCA1-positive breast cancer patients. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 115, p. 359–363, 2009.

CADY, B. Use of primary breast carcinoma characteristics to predict lymph node metastases. **Cancer**, v. 79, p. 1856–1861, 1997.

CARADEC, J.; SIRAB, N.; KEUMEUGNI, C. “Desperate house genes”: the dramatic example of hypoxia. **British Journal Cancer**, v. 102, p. 1037–1043, 2010.

CARTER, C.L.; ALLEN, C.; HENSON, D.E. Relation of tumor size, lymph node state and survival in 24,740 breast cancer cases. **Cancer**, v. 63, p. 181–187, 1989.

CHEANG, M.C.U.; CHIA, S.K.; VODUC, D.; GAO, D.; LEUNG, S.; SNIDER, J.; WATSON, M.; DAVIES, S.; BERNARD, P.S.; PARKER, J.S.; PEROU, C.M.; ELLIS, M.J.; NIELSEN, T.O. Ki-67 Index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 101, p. 736–750, 2009.

CHEN, C.C.; TANIGUCHI, T.; D'ANDREA, A. The Fanconi anemia (FA) pathway confers glioma resistance to DNA alkylating agents. **Journal of Molecular Medicine**, v. 85, n. 5, p. 497–509, 2007.

CHEN, Z.H.; OLOPADE, O.I.; SAVARESE, T.M. Expression of methylthioadenosine phosphorylase cDNA in p16-, MTAP-malignant cells: restoration of methylthioadenosine phosphorylase-dependent salvage pathways and alterations of sensitivity to inhibitors of purine de novo synthesis. **Molecular Pharmacology**, v. 52, p. 903–911, 1997.

CHRISTOPHER, S.A.; DIEGELMAN, P.; PORTER, C.W.; KRUGER, W.D. Methylthioadenosine Phosphorylase, a Gene Frequently Codeleted with p16cdkN2a/ARF, Acts as a Tumor Suppressor in a Breast Cancer Cell Line. **Cancer Research**, v. 62, p. 6639–6644, 2002.

CLEATOR, S.; HELLER, W.; COOMBES, R.C. Triple-negative breast cancer: therapeutic options. **Lancet Oncology**, v. 8, n. 3, p. 235–244, 2007.

COLLINS, N.; WOOSTER, R.; STRATTON, M.R. Absence of methylation of CpG dinucleotides within the promoter of the breast cancer susceptibility gene BRCA2 in normal tissues and in breast and ovarian cancers. **Br. J. Cancer**, v. 76, p. 1150–1156, 1997.

CONNOR, A.J.M.; PINDER, S.E.; ELSTON, C.W.; *et al.* Intratumoral heterogeneity of proliferation in invasive breast carcinoma evaluated with MIB-1 antibody. **Breast**, v. 6, p. 171–176, 1997.

CORREA, A.G. Taxol: da descoberta ao uso terapêutico. **Química Nova**, v.18, n.5, p. 460-467, 1995.

CORTEZ, D.; WANG, Y.; QIN, J.; ELLEDGE, S.J. Requirement of ATM-dependent phosphorylation of brca1 in the DNA damage response to double-strand breaks. **Science**, v. 286, n. 5442, p. 1162–1166, 1999.

COUGHLIN, S.S.; EKWUEME, D. U. Breast cancer as a global health concern. **Cancer Epidemiology**, Epub ahead of print, 2009.

COUSSENS, L.; YANG-FENG, T.L.; LIAO, Y.C.; CHEN, E.; GRAY, A.; MCGRATH, J.; SEEBURG, P.H.; LIBERMANN, T.A.; SCHLESSINGER, J.; FRANCKE, U. Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene. **Science**, v. 230, p. 1132-1139, 1985.

CRESPO, I.; TAO, H.; NIETO, A.B.; REBELO, O.; DOMINGUES, P.; VITAL, A.L.; PATINO, M.C.; BARBOSA, M.; LOPES, M.C.; OLIVEIRA, C.R.; ORFAO, A.; TABERNERO, M.D. Amplified and Homozygously Deleted Genes in Glioblastoma: Impact on Gene Expression Levels. **PLoS ONE**, v. 7, p. e46088, 2012.

CUMMING, R.C.; LIGHTFOOT, J.; BEARD, K.; YOUSSEF, H.; O'BRIEN, P.J.; BUCHWALD, M. Fanconi anemia group C protein prevents apoptosis in hematopoietic cells through redox regulation of GSTP1. **National Medicine**, v. 7, p. 814–820, 2001.

CURTIS, C.; SHAH, S.P.; CHIN, S.; TURASHVILI, G.; RUEDA, O.M.; DUNNING, M.J.; SPEED, D.; LYNCH, A.G.; SAMARAJIWA, S.; YUAN, Y.; GRA, S.; HA, G.; HAFARI, G.; BASHASHATI, A.; RUSSELL, R.; MCKINNEY, S.; METABRIC GROUP; LANGERØD, A.; GREEN, A.; PROVENZANO, E.; WISHART, G.; PINDER, S.; WATSON, P.; MARKOWETZ, F.; MURPHY, L.; ELLIS, I.; PURUSHOTHAM, A.; BØRRESEN-DALE, A.; BRENTON, J.D.; TAVARE, S.; CALDAS, C.; APARICIO, S. The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups. **Nature**, v. 18, p. 346-352, 2012.

DALHUS, B.; LAERDAHL, J.K.; BACKE, P.H.; BJØRA, M. DNA base repair recognition and initiation of catalysis. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 33, p. 1044–1078, 2009.

DE BOER, J.; HOEIJMAKERS, J.H.J. Nucleotide excision repair and human syndromes. **Carcinogenesis**, v. 21, p. 453–460, 2000.

DE OLIVEIRA, S.F.V.; OLIVEIRA, M.M.C.; URBAN, C.A.; DE LIMA, R.S.; CAVALLI, I.J.; RIBEIRO, E.M.S.F. Lack of association between LOH in the 9p region and clinicopathologic parameters in primary breast cancer. **Cancer Genetics and Cytogenetics**, v. 200, p. 23-27, 2010.

DE WINTER, J.P.; VAN DER WEEL, L.; DE GROOT, J.; STONE, S.; WAISFISZ, Q.; ARWERT, F.; SCHEPER, R.J.; KRUYT, F.A.; HOATLIN, M.E.; JOENJE, H. The Fanconi Anemia protein FANCF forms a nuclear complex with FANCA, FANCC and FANCG. **Human Molecular Genetics**, v. 9, n. 18, p. 2665-2674, 2000.

DIAB, S.G.; CLARK, G.M.; OSBORNE, C.K.; LIBBY, A.; ALLRED, D.C.; ELLEDGE, R.M. Tumor characteristics and clinical outcome of tubular and mucinous breast carcinoma- mas. **Journal of Clinical Oncology**, v. 17, p. 1442-1448, 1999.

DIAZ, L.K.; CRYNS, V.L.; SYMMANS, W.F.; SNEIGE, N. Triple negative breast carcinoma and the basal phenotype: from expression profile to clinical practice. **Advances in Anatomic Pathology**, v. 14, n. 6, p. 419-430, 2007.

DI FIORE, P.P.; PIERCE, J.H.; FLEMING, T.P.; HAZAN, R.; ULLRICH, A.; KING, C.R.; SCHLESSINGER, J.; AARONSON, S.A. Overexpression of the human EGF receptor confers an EGF-dependent transformed phenotype to NIH 3T3 cells. **Cell**, v. 51, p. 1063-1070, 1987.

DUNN, J.; POTTER, M.; REES, A.; RUNGER, T.M. Activation of the Fanconi anemia/BRCA pathway and recombination repair in the cellular response to solar ultraviolet light. **Cancer Research**, v. 66, n. 23, p. 11140-11147, 2006.

DYDENSBORG, A.B.; HERRING, E.; AUCLAIR, J.; TREMBLAY, E.; BEAULIEU, J.F. Normalizing genes for quantitative RT-qPCR in differentiating human intestinal epithelial cells and adenocarcinomas of the colon. **American Journal of Physiology - Gastrointestinal Liver Physiology**, v. 290, p. 1067-1074, 2006.

EARLY BREAST CANCER TRIALISTS' COLLABORATIVE GROUP (EBCTCG), PETO, R.; DAVIES, C.; GODWIN, J.; GRAY, R.; PAN, H.C.; CLARKE, M.; CUTTER, D.; DARBY, S.; MCGALE, P.; TAYLOR, C.; WANG, Y.C.; BERGH, J.; DI LEO, A.; ALBAIN, K.; SWAIN, S.; PICCART, M.; PRITCHARD, K. Comparisons between different polychemotherapy regimens for early breast cancer: meta-analyses of long-term outcome among 100,000 women in 123 randomised trials. **Lancet**, v. 379, p.

432–444, 2012.

EIFEL, P.; AXELSON, J.A.; COSTA, J.; CROWLEY, J.; CURRAN, W.J.; DESHLER, A.; FULTON, S.; HENDRICKS, C.B.; KEMENY, M.; KORNBLITH, A.B.; LOUIS, T.A.; MARKMAN, M.; MAYER, R.; ROTER, D. National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement: adjuvant therapy for breast cancer. **Journal of National Cancer Institute**, v. 93, n. 13, p. 979–989, 2001.

EROLE, P.; BOSCH, A.; PÉREZ-FIDALGO, J.A.; LLUCH, A. Molecular biology in breast cancer: Intrinsic subtypes and signaling pathways. **Cancer Treatment Reviews**, v. 38, p. 698–707, 2012.

aFARMER, H.; McCABE, N.; LORD, C.J.; TUTT, A.N.; JOHNSON, D.A.; RICHARDSON, T.B.; SANTAROSA, M.; DILLON, K.J.; HICKSON, I.; KNIGHTS, C.; MARTIN, N.M.; JACKSON, S.P.; SMITH, G.C.; ASHWORTH, A. Targeting the DNA repair effect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. **Nature**, v. 434, n. 7035, p. 917–921, 2005.

bFARMER, P.; BONNEFOI, H.; BECETTE, V.; TUBIANA-HULIN, M.; FUMOLEAU, P.; LARSIMONT, D.; MACGROGAN, G.; BERGH, J.; CAMERON, D.; GOLDSTEIN, D.; DUSS, S.; NICOULAZ, A.L.; BRISKEN, C.; FICHE, M.; DELORENZI, M.; IGGO, R. Identification of molecular apocrine breast tumours by microarray analysis. **Oncogene**, v. 24, p. 4660–4671, 2005.

FEARON, E.R.; VOGELSTEIN, B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. **Cell**, v. 1, n. 61, p. 759–767, 1990.

FERRERO-POUS, M.; HACENE, K.; BOUCHET, C.; LE DOUSSAL, V.; TUBIANA-HULIN, M.; SPYRATOS, F. Relationship between c-ERBB-2 and other tumor characteristics in breast cancer prognosis. **Clinical Cancer Research**, v. 6, p. 4745–4754, 2000.

FISHER, E.R.; ANDERSON, S.; REDMOND, C.; FISHER, B. Pathologic findings from the National Surgical Adjuvant Breast Project Protocol B-06: 10-year pathologic and clinical prognostic discriminants. **Cancer**, v. 71, p. 2507–2514, 1993.

FU, J.; BIAN, L.; ZHAO, L.; DONG, Z.; GAO, X.; LUAN, H.; SUN, Y.; SONG, H. Identification of genes for normalization of quantitative real-time PCR data in ovarian tissues. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica** v. 42, p. 568–574, 2010.

GALEA, M.H.; BLAMEY, R.W.; ELSTON, C.E.; ELLIS, I.O. The Nottingham

Prognostic Index in primary breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 22, p. 207-219, 1992.

GANZINELLI, M.; MARIANI, P.; CATTANEO, D.; FOSSATI, R.; FRUSCIO, R.; CORSO, S.; RICCI, F.; BROGGINI, B.; DAMIA, G. Expression of DNA repair genes in ovarian cancer samples: Biological and clinical considerations. *European Journal of Cancer*, v. 47, p. 1086-1094, 2011.

GAO, Y.; ZHU, J.; ZHANG, X.; WU, Q.; JIANG, S.; LIU, Y.; HU, Z.; LIU, B.; CHEN, X. BRCA1 mRNA Expression as a Predictive and Prognostic Marker in Advanced Esophageal Squamous Cell Carcinoma Treated with Cisplatin- or Docetaxel-Based Chemotherapy/Chemoradiotherapy. **PLoS ONE**, v. 8, p. e52589, 2013

GARCIA-HIGUERA, I.; TANIGUCHI, T.; GANESAN, S.; MEYN, M.S.; TIMMERS, C.; HEJNA, J.; GROMPE, M.; D'ANDREA, A.D. Interaction of the Fanconi anemia proteins and BRCA1 in a common pathway. **Molecular Cell**, v. 7, p. 249-262, 2001.

GOLDHIRSCH, A.; WOOD, W.C.; COATES, A.S.; GELBER, R.D.; THURLIMANN, B.; SEEN, H.J. Strategies for subtypes—dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer. **Annals of Oncology**, v. 22, p. 1736-1747, 2011.

GREENBERG, R.A. Recognition of DNA double strand breaks by the BRCA1 tumor suppressor network. **Chromosoma**, v. 4, p. 305–317, 2008.

GREIDER, C. W.; BLACKBURN, E. Telomeres, telomerase and cancer. **Scientific American**, v. 274, p. 80-85, 1995.

HANAWALT, P.C. Subpathways of nucleotide excision repair and their regulation. **Oncogene**, v. 21, p. 8949–8956, 2002.

HARRIS, L.; FRITSCH, H.; MENNEL, R.; NORTON, L.; RAVDIN, P.; TAUBE, S.; SOMERFIELD, M.; HAYES, D.; BAST JR, R. American Society of Clinical Oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer. **J Clin Oncol**, v. 25, p. 5287–5312, 2007.

HAYS, L.E. Multifunctionality of the FA pathway. **Blood**, v. 121, n. 1, p. 3-4, 2013.

HEINRICH, M.C.; SILVEY, K.V.; STONE, S.; ZIGLER, A.J.; GRIFFITH, D.J.; MONTALTO, M.; CHAI, L.; ZHI, Y.; HOATLIN, M.E. Posttranscriptional cell cycle–

dependent regulation of human FANCC expression. **Blood**, v. 95, n. 12, p. 3970-3977, 2000.

HELLEDAY, T.; PETERMANN, E.; LUNDIN, C.; HODGSON, B.; SHARMA, R.A. DNA repair pathways as targets for cancer therapy. **Nature Reviews**, v. 8, p. 193-204, 2008.

HENSON, D.E.; RIES, L.; FREEDMAN, L.S.; CARRIAGA, M. Relationship among outcome, stage of disease, and histologic grade for 22,616 cases of breast cancer. The basis for a prognostic index. **Cancer**, v. 68, p. 2142-2149, 1991.

HERNANDEZ-AYA, L.F.; GONZALEZ-ANGULO, A.M. Adjuvant Systemic Therapies in Breast Cancer. **Surgical Clinics of North America**, v. 93, p. 473-491, 2013.

HERSCHKOWITZ, J.I.; SIMIN, K.; WEIGMAN, V.J.; MIKAELIAN, I.; USARY, J.; HU, Z.; RASMUSSEN, K.E.; JONES, L.P.; ASSEFNIA, S.; CHANDRASEKHARAN, S.; BACKLUND, M.G.; YIN, Y.; KHRAMTSOV, A.I.; BASTEIN, R.; QUACKENBUSH, J.; GLAZER, R.I.; BROWN, P.H.; GREEN, J.E.; KOPELOVICH, L.; FURTH, P.A.; PALAZZO, J.P.; OLOPADE, O.I.; BERNARDS, P.S.; CHURCHILL, G.A.; VAN DYKE, T.; PEROU, C.M. Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. **Genome Biology**, v.8, n. 5, R76, 2007.

HILTON, J.L.; GEISLER, J.P.; RATHE, J.A.; HATTERMANN-ZOGG, M.A.; DEYOUNG, B.; BULLER, R.E. Inactivation of BRCA1 and BRCA2 in ovarian cancer. **J. Natl Cancer Inst.**, v. 94, p. 1396-1406, 2002.

HOEIJMAKERS, J.H. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. **Nature**, v. 411, p. 366-374, 2001.

HOWLETT, N.G.; TANIGUCHI, T.; OLSON, S.; COX, B.; WAISFISZ, Q.; DE DIESMULDERS, C.; PERSKY, N.; GROMPE, M.; JOENJE, H.; PALS, G.; IKEDA, H.; FOX, E.A.; D'ANDREA, A.D. Biallelic inactivation of BRCA2 in Fanconi anemia. **Science**, v. 297, n. 5581, p. 606-609, 2002.

HUGHES-DAVIES, L.; HUNTSMAN, D.; RUAS, M.; FUKS, F.; BYE, J.; CHIN, S.; MILNER, J.; BROWN, L.A.; HSU, F.; GILKS, B.; NIELSEN, T.; SCHULZER, M.; CHIA, S.; RAGAZ, J.; CAHN, A.; LINGER, L.; OZDAG, H.; CATTANEO, E.; JORDANOVA, E.S.; SCHUURING, E.; YU, D.S.; VENKITARAMAN, A.; PONDER, B.; DOHERTY, A.; APARICIO, S.; BENTLEY, D.; THEILLET, C.; PONTING, C.P.; CALDAS, C.; KOUZARIDES, T. EMSY links the BRCA2 pathway to sporadic breast and ovarian cancer. **Cell**, v. 115, p. 523-535, 2003.

HUSSAIN, S.; WILSON, J.B.; MEDHURST, A.L.; HEJNA, J.; WITT, E.; ANANTH, S.; DAVIES, A.; MASSON, J.Y.; MOSES, R.; WEST, S.C.; DE WINTER, J.P.; ASHWORTH, A.; JONES, N.J.; MATHEW, C.G. Direct interaction of FANCD2 with BRCA2 in DNA damage response pathways. **Human Molecular Genetics**, v. 13, p. 1241–48, 2004.

HUSTINX, S.R.; LEONI, L.M.; YEO, C.J.; BROWN, P.N.; GOGGINS, M.; KERN, S.E.; HRUBAN, R.H.; MAITRA, A. Concordant loss of MTAP and p16/CDKN2A expression in pancreatic intraepithelial neoplasia: evidence of homozygous deletion in a noninvasive precursor lesion. **Modern Pathology**, v. 18, p. 959–963, 2005.

HU, Z.; FAN, C.; OH, D.S.; MARRON, J.S.; HE, X.; QAQISH, B.F.; LIVASY, C.; CAREY, L.A.; REYNOLDS, E.; DRESSLER, L.; NOBEL, A.; PARKER, J.; EWEND, M.G.; SAWYER, L.R.; WU, J.; LIU, Y.; NANDA, R.; TRETIAKOVA, M.; RUIZ ORRICO, A.; DREHER, D.; PALAZZO, J.P.; PERREARD, L.; NELSON, E.; MONE, M.; HANSEN, H.; MULLINS, M.; QUACKENBUSH, J.F.; ELLIS, M.J.; OLOPADE, O.I.; BERNARD, P.S.; PEROU, C.M. The molecular portraits of breast tumors are conserved across microarray platforms. **BMC Genomics**, v. 7, p. e96, 2006.

INCA. Instituto Nacional do Câncer. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativa 2008: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br>>, 2008.

INCA. Instituto Nacional do Câncer. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativa 2010: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br>>, 2009.

INCA Instituto Nacional do Cancer. Ministério da Saude. Secretaria de Atenção à Saúde. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativa 2012: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br>>, 2012.

IRA, G.; PELLICCIOLI, A.; BALIJJA, A.; WANG, X.; FIORANI, S.; CAROTENUTO, W.; LIBERI, G.; BRESSAN, D.; WAN, L.; HOLLINGSWORTH, N.M.; HABER, J.E.; FOIANI, M. DNA end resection, homologous recombination and DNA damage checkpoint activation require CDK1. **Nature**, v. 431, n. 7011, p. 1011–1017, 2004.

ISHII, M.; NAKAZAWA, K.; WADA, H.; NISHIOKA, J.; NAKATANI, K.; YAMADA, Y.; KAMIHIRA, S.; KUSUNOKI, M.; NOBORI, T. Methylthioadenosine phosphorylase gene is silenced by promoter hypermethylation in human lymphoma cell line DHL-9: Another mechanism of enzyme deficiency. **International Journal of Oncology**, v. 26, p. 985–991, 2005.

JENSEN, R.A.; THOMPSON, M.E.; JETTON, T.L.; SZABO, C.I.; VAN DER MEER, R.; HELOU, B.; TRONICK, S.R.; PAGE, D.L.; KING, M.C.; HOLT, J.T. BRCA1 is secreted and exhibits properties of a granin. **Nature Genetics**, v. 12, p. 303-308, 1996.

JONES, M.J.K.; HUANG, T.T. The Fanconi anemia pathway in replication stress and DNA crosslink repair. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.69, n. 23, p. 3963-3974, 2012.

KADARIYA, Y.; TANG, B.; MYERS, C.B.; FUKUI, J.; PETERSON, J.R.; KRUGER, W.D. Chemical Genetic Screening for Compounds that Preferentially Inhibit Growth of Methylthioadenosine Phosphorylase (MTAP) Deficient *Saccharomyces Cerevisiae*. **Journal of Biomolecular Screening**, v. 1, p. 44–52, 2011.

KANG, S.P.; MARTEL, M.; HARRIS, L.N. Triple negative breast cancer: current understanding of biology and treatment options. **Current Opinion in Obstetrics and Gynecology**, v. 20, n. 1, p. 40-46, 2008.

KAO, W.H.; RIKER, A.I.; KUSHWAHA, D.S.; NG, K.; ENKEMANN, S.A.; JOVE, R.; BUETTNER, R.; ZINN, P.O.; SÁNCHEZ, N.P.; VILLA, J.L.; D'ANDREA, A.D.; SÁNCHEZ, J.L.; KENNEDY, R.D.; CHEN, C.C.; MATTA, J.L. Upregulation of Fanconi Anemia DNA Repair Genes in Melanoma Compared to Non-Melanoma Skin Cancer. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 10, p. 2139–2142, 2011.

KEE, Y.; D'ANDREA, A.D. Expanded roles of the Fanconi anemia pathway in preserving genomic stability. **Genes & Development**, v. 24, p. 1680–1694, 2010.

KENNECKE, H.; YERUSHALMI, R.; WOODS, R.; CHEANG, M.C.U.; VODUC, D.; SPEERS, C.H.; Nielsen, T.O.; Gelmon, K. et al. Metastatic Behavior of Breast Cancer Subtypes. **Journal of Clinical Oncology**, v. 28, p. 3271-3277, 2010.

KENNEDY, R.D.; CHEN, C.C.; STUCKERT, P.; ARCHILA, E.M.; DELAVEGA, M.A.; MOREAU, L.A.; SHIMAMURA, A.; D'ANDREA, A.D. Fanconi anemia pathway deficient tumor cells are hypersensitive to inhibition of ataxia telangiectasia mutated. **Journal of Clinical Investigation**, v. 117, p. 1440–1449, 2005.

KETTERHAGEN, J.P.; QUAKENBUSH, S.R.; HAUSHALTER, R.A. Tumor histology as a prognostic determinant in carcinomas of the breast. **Surgery Gynecology & Obstetrics**, v. 158, p. 120-123, 1984.

KHEIRELSEID, E.A.H.; CHANG, K.H.; NEWELL, J.; KERIN, M.J.; MILLER, N. Identification of endogenous control genes for normalisation of real-time quantitative PCR data in colorectal cancer. **BMC Molecular Biology**, v. 11, n. 12, 2010.

KIM, J.; KIM, M.A.; MIN, S.Y.; JEE, C.D.; LEE, H.E.; KIM, W.H. Downregulation of Methylthioadenosin Phosphorylase by Homozygous Deletion in Gastric Carcinoma. **Genes, Chromosomes & Cancer**, v. 50, p. 421-433, 2011.

KOK, J.B.; ROELOFS, R.W.; GIESENDORF, B.A. Normalization of gene expression measurements in tumor tissues: comparison of 13 endogenous control genes. **Laboratory Investigation - Nature**, v. 85, p. 154-159, 2005.

KONECNY, G.; PAULETTI, G.; PEGRAM, M.; UNTCH, M.; DANDEKAR, S.; AGUILAR, Z.; WILSON, C.; RONG, H.M.; BAUERFEIND, I.; FELBER, M.; WANG, H.J.; BERYT, M.; SESHADRI, R.; SLAMON, D.J. Quantitative association between HER-2/neu and steroid hormone receptors in hormone receptor positive primary breast cancer. **Journal of National Cancer Institute**, v. 95, p. 142-153, 2003.

KRIMPENFORT, P.; IJPENBERG, A.; SONG, J.Y.; VAN DER VALK, M.; NAWIJN, M.; ZEVENHOVEN, J.; BERNIS, A. p15Ink4b is a critical tumour suppressor in the absence of p16Ink4a. **Nature**, v. 448, p. 943–946, 2007.

LAFARGE, S.; SYLVAIN, V.; FERRARA, M.; BIGNON, Y.J. Inhibition of BRCA1 leads to increased chemoresistance to microtubule-interfering agents, an effect that involves the JNK pathway. **Oncogene**, v. 20, p. 6597–6606, 2001.

LEE, J.S.; COLLINS, K.M.; BROWN, A.L.; LEE, C.H.; CHUNG, J.H. hCds1-mediated phosphorylation of BRCA1 regulates the DNA damage response. **Nature**, v. 404, n. 6774, p. 201–204, 2000.

LEITNER, S.P.; SWERN, A.S.; WEINBERGER, D.; DUNCAN, L.J.; HUTTER, R.V. Predictors of recurrence for patients with small (one centimeter or less) localized breast cancer (T1a,b N0 M0). **Cancer**, v. 76, p. 2266–2274, 1995.

LENGAUER, C.; KINZLER, K. W.; VOGELSTEIN, B. Genetic instabilities in human cancers. **Nature**, v. 396, p. 643-649, 1998.

LEONG, A.S.Y.; ZHUANG, Z. The Changing Role of Pathology in Breast Cancer Diagnosis and Treatment. **Pathobiology**, v. 78, p. 99–114, 2011.

LEVITUS, M.; WAISFISZ, Q.; GODTHELP, B.C.; DE VRIES, Y.; HUSSAIN, S.;

WIEGANT, W.W.; ELGHALBZOURI-MAGHRANI, E.; STELTENPOOL, J.; ROOIMANS, M.A.; PALS, G.; ARWERT, F.; MATHEW, C.G.; ZDZIENICKA, M.Z.; HIOM, K.; DE WINTER, J.P.; JOENJE, H. The DNA helicase BRIP1 is defective in Fanconi anemia complementation group. **Nature Genetics**, v. 9, p. 934-935, 2005.

LEVRAN, O.; ATTWOOLL, C.; HENRY, R.T.; MILTON, K.L.; NEVELING, K.; RIO, P.; BATISH, S.D.; KALB, R.; VELLEUER, E.; BARRAL, S.; OTT, J.; PETRINI, J.; SCHINDLER, D.; HANENBERG, H.; AUERBACH, A.D. The BRCA1-interacting helicase BRIP1 is deficient in Fanconi anemia. **Nature Genetics**, v. 9, p. 931-933, 2005.

LITMAN, R.; GUPTA, R.; BROSH JR, R.M.; CANTOR, S.B. BRCA-FA pathway as a target for anti-tumor drugs. **Anticancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 8, n. 4, p. 426-430, 2008.

LITMAN, R.; PENG, M.; JIN, Z.; ZHANG, F.; ZHANG, J.; POWELL, S.; ANDREASSEN, P.R.; CANTOR, S.B. BACH1 is critical for homologous recombination and appears to be the Fanconi anemia gene product FANCF. **Cancer Cell**, v. 3, p. 255-265, 2005.

LIU, Y.; WEST, S.C. Distinct functions of BRCA1 and BRCA2 in double-strand break repair. **Breast Cancer Research**, v. 4, n. 1, p. 9-13, 2002.

LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. **Methods**, v. 25, p. 402-408, 2001.

LOI, S. Molecular analysis of hormone receptor positive (luminal) breast cancers – What have we learnt? **European Journal of Cancer**, v. 44, p. 2813 – 2818, 2008.

LO TEN FOE, J.R.; ROOIMANS, M.A.; BOSNOYAN-COLLINS, L.; ALON, N.; WIJCKER, M.; PARKER, L.; LIGHTFOOT, J.; CARREAU, M.; CALLEN, D.F.; SAVOIA, A.; CHENG, N.C.; VAN BERKEL, C.G.M.; STRUNK, M.H.P.; GILLE, J.J.P.; PALS, G.; KRUYT, F.A.E.; PRONK, J.C.; ARWERT, F.; BUCHWALD, M.; JOENJE, H. Expression cloning of a cDNA for the major Fanconi anemia gene, FANCF. **Nature Genetics**, v. 14, p. 320-323, 1996.

LUBIN, M.; LUBIN, A. Selective killing of tumors deficient in methylthioadenosine phosphorylase: a novel strategy. **PLOS ONE**, v. 4, n. 5, 2009.

MARCE, S.; BALAGUE, O.; COLOMO, L.; MARTINEZ, A.; HOLLER, S.; VILLAMOR,

N.; BOSCH, F.; OTT, G.; ROSENWALD, A.; LEONI, L.; ESTELLER, M.; FRAGA, M.F.; MONTSERRAT, E.; COLOMER, D.; CAMPO, E. Lack of Methylthioadenosine Phosphorylase Expression in Mantle Cell Lymphoma Is Associated with Shorter Survival: Implications for a Potential Targeted Therapy. **Clinical Cancer Research**, v. 12, p. 3754-3761, 2006

MARIE, K.; PAROLA, B.; DORTHE, G.; KRISTINA, L.; PER, M.; MARTEN, F.; for the South Sweden Breast Cancer Group. The prognostic value of Ki67 is dependent on estrogen receptor status and histological grade in premenopausal patients with node-negative breast cancer. **Modern Pathology**, v. 23, p. 251–259, 2010.

MASTERS, S.C.; YANG, H.; DATTA, S.R.; GREENBERG, M.E.; FU, H. 14-3-3 inhibits Bad-induced cell death through interaction with serine-136. **Molecular Pharmacology**, v. 60, p. 1325–1331, 2001.

MASUDA, S. Breast cancer pathology: The impact of molecular taxonomy on morphological taxonomy. **Pathology International**, v. 62, p. 295-302, 2012.

MEIJERINK, J.; MANDIGERS, C.; VAN DE LOCHT, L.; TÖNNISSEN, E.; GOODSID, F.; RAEMAEKERS, J. A novel method to compensate for different amplification efficiencies between patient DNA samples in quantitative real-time PCR. **Journal of Molecular Diagnostics**, v. 3, p. 55-61, 2001.

MIRCHANDANI, K.D.; D'ANDREA, A.D. The Fanconi anemia/BRCA pathway: a coordinator of cross-link repair. **Experimental Cell Research**, v. 312, p. 2647–2653, 2006.

MIYAZAKI, S.; NISHIOKA, J.; SHIRAISHI, T.; MATSUMINE, A.; UCHIDA, A.; NOBORI, T. Methylthioadenosine phosphorylase deficiency in Japanese osteosarcoma patients. **International Journal of Oncology**, v. 31, p. 1069-1076, 2007.

MOLDOVAN, G.L.; D'ANDREA, A.D. How the Fanconi Anemia Pathway Guards the Genome. **Annual Review of Genetics**, v. 43, p.223–249, 2009.

MOLINO, A.; MICCIOLO, R.; TURAZZA, M.; BONETTI, F.; PIUBELLO, Q.; BONETTI, A.; NORTILLI, R.; PELOSI, G.; CETTO, G.L. Ki-67 immunostaining in 322 primary breast cancers: association with clinical and pathological variables and prognosis. **International Journal of Cancer**, v. 74, p. 433–437, 1997.

MORSE, D.L.; CARROLL, D.; WEBER, L.; BORGSTROM, M.C.; RANGER-MOORE, J.; GILLIES, R.J. Determining suitable internal standards for mRNA quantification of increasing cancer progression in human breast cells by real-time

reverse transcriptase polymerase chain reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 342, p. 69–77, 2005.

MOYNAHAN, M.E.; JASIN, M. Mitotic homologous recombination maintains genomic stability and suppresses tumorigenesis. **Nature Reviews**, v. 11, p. 196–207, 2010.

MULLAN, P.B.; MILLIKAN, R.C. Molecular subtyping of breast cancer: opportunities for new therapeutic approaches. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 64, p. 3219–3232, 2007.

NARAYAN, G.; ARIAS-PULIDO, H.; NANDULA, S.V.; BASSO, K.; SUGIRTHARAJ, D.D.; VARGAS, H.; MANSUKHANI, M.; VILLELLA, J.; MEYER, L.; SCHNEIDER, A.; GISSMANN, L.; POTHURI, M.R.B.; MURTY, V.V.V.S. Promoter Hypermethylation of *FANCF*: Disruption of Fanconi Anemia-BRCA Pathway in Cervical Cancer. **Cancer Research**, v. 64, p. 2994–2997, 2004.

NITTA, M.; KOZONO, D.; KENNEDY, R.; STOMMEL, J.; NG, K.; ZINN, P.O.; KUSHWAHA, D.; KESARI, S.; INDA, M.D.; WYKOSKY, J.; FURNARI, F.; HOADLEY, K.A.; CHIN, L.; DEPINHO, R.A.; CAVENEE, W.K.; D'ANDREA, A.; CHEN, C.C. Targeting EGFR induced oxidative stress by PARP1 inhibition in glioblastoma therapy. **PLoS ONE**, v. 5, p. e10767, 2010.

OLSZEWSKI, W.; CHMIELIK, E.; RYS, J. Pathomorphological selection of patients to systemic therapy. **Pol J Pathol**, v. 4, p. 28–33, 2011.

O'SHAUGHNESSY, J. Extending survival with chemotherapy in metastatic breast cancer. **Oncologist**, v. 10, p. 20–29, 2005.

OZAWA, H.; IWATSUKI, M.; MIMORI, K.; SATO, T.; JOHANSSON, F.; TOH, H.; WATANABE, M.; MORI, M. FANCD2 mRNA Overexpression is a Bona Fide Indicator of Lymph Node Metastasis in Human Colorectal Cancer. **Annals of Surgical Oncology**, v. 17, p. 2341–2348, 2010.

PARK, C.J.; CHOI, B.S. The protein shuffle: sequential interactions among components of the human nucleotide excision repair pathway. **FEBS Journal**, v. 273, p. 1600–1608, 2006.

PARKER, J.S.; MULLINS, M.; CHEANG, M.C.; LEUNG, S.; VODUC, D.; VICKERY, T.; DAVIES, S.; FAURON, C.; HE, X.; HU, Z.; QUACKENBUSH, J.F.; STIJLEMAN, I.J.; PALAZZO, J.; MARRON, J.S.; NOBEL, A.B.; MARDIS, E.; NIELSEN, T.O.; ELLIS, M.J.; PEROU, C.M.; BERNARD, P.S. Supervised risk predictor of breast

cancer based on intrinsic subtypes. **Journal of Clinical Oncology**, v. 27, p. 1160 – 1167, 2009

PEROU, C.M.; SORLIE, T.; EISEN, M.B.; VAN DE RIJN, M.; JEFFREY, S.S.; REES, C.A.; POLLACK, J.R.; ROSS, D.T.; JOHNSEN, H.; AKSLEN, L.A.; FLUGE, O.; PERGAMENSCHIKOV, A.; WILLIAMS, C.; ZHU, S.X.; LØNNING, P.E.; BØRRESEN-DALE, A.L.; BROWN, P.O.; BOTSTEIN, D. Molecular portraits of human breast tumors. **Nature**, v. 406, p. 747-752, 2000.

PEROU, C.M. Molecular stratification of triple-negative breast cancers. **Oncologist**, v. 16, n. 1, p. 61-70, 2011.

PICCART-GEBHART, M.J.; PROCTER, M.; LEYLAND-JONES, B.; GOLDBIRSH, A.; UNTCH, M.; SMITH, I.; GIANNI, L.; BASELGA, J.; BELL, R.; JACKISCH, C.; CAMERON, D.; DOWSETT, M.; BARRIOS, C.H.; STEGER, G.; HUANG, C.S.; ANDERSSON, M.; INBAR, M.; LICHINITSER, M.; LÁNG, I.; NITZ, U.; IWATA, H.; THOMSEN, C.; LOHRISCH, C.; SUTER, T.M.; RÜSCHOFF, J.; SUTO, T.; GREATOREX, V.; WARD, C.; STRAEHLE, C.; MCFADDEN, E.; DOLCI, M.S.; GELBER, R.D.; HERCEPTIN ADJUVANT (HERA) TRIAL STUDY TEAM. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER-2-positive breast cancer. **National England Journal of Medicine**, v. 353, p. 1659-1672, 2005.

POTAPOVA, A.; HOFFMAN, A.M.; GODWIN, A.K.; AL-SALEEM, T.; CAIRNS, P. Promoter Hypermethylation of the *PALB2* Susceptibility Gene in Inherited and Sporadic Breast and Ovarian Cancer. **Cancer Research**, v. 68, p. 998-1002, 2008.

PRAT, A.; PEROU, C.M. Mammary development meets cancer genomics. **National Medicine**, v. 15, p. 842– 844, 2009.

PRONK, J.C.; GIBSON, R.A.; SAVOIA, A.; WIJCKER, M.; MORGAN, N.V.; MELCHIONDA, S.; FORD, D.; TEMTAMY, S.; ORTEGA, J.J.; JANSEN, S.; HAVENGA, C.; COHN, R.J.; DE RAVEL, T.J.; ROBERTS, I.; WESTERVELD, A.; EASTON, D.F.; JOENJE, H.; MATHEW, C.G.; ARWERT, F. Localization of the Fanconi anaemia complementation group A gene to chromosome 16q24.3. **Nature Genetics**, v. 11, p. 338-340, 1995.

RADONIC, A.; THULKE, S.; MACKAY, I.M.; LANDT, O.; SIEGERT, W.; NITSCHKE, A. Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 313, p. 856-862, 2004.

RAKHA, E.A.; EL-SHEIKH, S.E.; KANDIL, M.A.; EL-SAYED, M.E.; GREEN, A.R.; ELLIS, I.O. Expression of BRCA1 protein in breast cancer and its prognostic

significance. **Human Pathology**, v. 39, p. 857–865, 2008.

REID, L.J.; SHAKYA, R.; MODI, A.P.; LOKSHIN, M.; CHENG, J.T.; JASIN, M.; BAER, R.; LUDWIG, T. E3 ligase activity of BRCA1 is not essential for mammalian cell viability or homology- directed repair of double-strand DNA breaks. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, p. 20876–20881, 2008.

REIS-FILHO, J.S.; TUTT, A.N. Triple negative tumours: a critical review. **Histopathology**, v. 52, n. 1, p. 108-118, 2008.

ROSEN, P.P.; GROSHEN, S.; KINNE, D.W.; NORTON, L. Factors influencing prognosis in node-negative breast carcinoma: analysis of 767 T1N0M0/T2N0M0 patients with long-term follow up. **Journal of Clinical Oncology**, v. 11, p. 2090–2100, 1993.

ROUNTREE, M.R.; BACHMAN, K.E.; HERMAN, J.G.; BAYLIN, S.B. DNA methylation, chromatin inheritance, and cancer. **Oncogene**, v. 20, p. 3156-3165, 2001.

ROUZIER, R.; PEROU, C.M.; SYMMANS, W.F.; IBRAHIM, N.; CRISTOFANILLI, M.; ANDERSON, K.; HESS, K.R.; STEC, J.; AYERS, M.; WAGNER, P.; MORANDI, P.; FAN, C.; RABIUL, I.; ROSS, J.S.; HORTOBAGYI, G.N.; PUSZTAI, L. Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy. **Clinical Cancer Research**, v. 1, p. 5678 – 5685, 2005.

RUAS, M.; PETERS, G. The p16INK4a/CDKN2A tumor suppressor and its relatives. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1378, p. 115–177, 1998.

RUBIE, C.; KEMPF, K.; HANS, J. Housekeeping gene variability in normal and cancerous colorectal, pancreatic, esophageal, gastric and hepatic tissues. **Molecular Cell Probes**, v. 19, p.101-109, 2005.

SAUDADE, A.; TOMÁS, A.R.; FONSECA, R. Determinação da Amplificação do HER2 por Hibridação *in situ* de Fluorescência (FISH). **Acta Medica Portuguesa**, v. 18, p. 417-422, 2005.

SCHMITTGEN, T.D.; LIVAK, K.J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. **Nature Protocols**, v. 3, n. 6, p. 1101-1108, 2008.

SCULLY, R.; LIVINGSTON, D.M. In search of the tumour-suppressor functions of

BRCA1 and BRCA2. **Nature**, v. 408, n. 6811, p. 429-432, 2000.

SHARPLESS, N.E. INK4a/ARF: a multifunctional tumor suppressor locus. **Mutation Research**, v. 576, p. 22–38, 2005.

SLAMON, D.J.; CLARK, G.M.; WONG, S.G.; LEVIN, W.J.; ULLRICH, A.; MCGUIRE, W.L. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of HER-2/ neu oncogene. **Science**, v. 235, p. 177-182, 1987.

SLOANE, J.P. National coordinating group for breast screening pathology: consistency of histopathological reporting of breast lesions detected by screening. **European Journal of Cancer**, v. 30A, p. 1414–1419, 1994.

SORBY, L.A.; ANDERSEN, S.N.; BUKHOLM, I.R.; JACOBSEN, M.B. Evaluation of suitable reference genes for normalization of real-time reverse transcription PCR analysis in colon cancer. **Journal of Experimental Clinical Cancer Research**, v. 29, p. 144, 2010.

SØRLIE, T.; PEROU, C.M.; TIBSHIRANI, R.; AAS, T.; GEISLER, S.; JOHNSEN, H.; HASTIE, T.; EISEN, M.B.; VAN DE RIJN, M.; JEFFREY, S.S.; THORSEN, T.; QUIST, H.; MATESE, J.C.; BROWN, P.O.; BOTSTEIN, D.; LØNNING, P.E.; BØRRESEN-DALE, A.L. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 98, p. 10869 –10874, 2001.

SØRLIE, T.; TIBSHIRANI, R.; PARKER, J.; HASTIE, T.; MARRON, J.S.; NOBEL, A.; DENG, S.; JOHNSEN, H.; PESICH, R.; GEISLER, S.; DEMETER, J.; PEROU, C.M.; LØNNING, P.E.; BROWN, P.O.; BØRRESEN-DALE, A.L.; BOTSTEIN, D. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 100, p. 8418 – 8423, 2003.

SOULIER, J.; LEBLANC, T.; LARGHERO, J.; DASTOT, H.; SHIMAMURA, A.; GUARDIOLA, P.; ESPEROU, H.; FERRY, C.; JUBERT, C.; FEUGEAS, J.P.; HENRI, A.; TOUBERT, A.; SOCIE, G.; BARUCHEL, A.; SIGAUX, F.; D'ANDREA, A.D.; GLUCKMAN, E. Detection of somatic mosaicism and classification of Fanconi anemia patients by analysis of the FA/BRCA pathway. **Blood**, v. 105, p. 1329-1336, 2005.

STRATHDEE, C.A.; DUNCAN, A.M.V.; BUCHWALD, M. Evidence for at least four Fanconi anaemia genes including FACC on chromosome 9. **Nature Genetics**, v. 1, p. 196-198, 1992.

SUNG, P. Catalysis of ATP-dependent homologous DNA pairing and strand exchange by yeast RAD51 protein. **Science**, v. 265, p. 1241–1243, 1994.

SY, S.M.; HUEN, M.S.; ZHU, Y.; CHEN, J. PALB2 regulates recombinational repair through chromatin association and oligomerization. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, p. 18302–18310, 2009.

TANG, B.; LI, Y.N.; KRUGER, W.D. Defects in Methylthioadenosine Phosphorylase Are Associated with but not Responsible for Methionine-dependent Tumor Cell Growth. **Cancer Research**, v. 60, p. 5543–5547, 2000.

TANIGUCHI, T.; D'ANDREA, A.D. Molecular pathogenesis of Fanconi-anemia: recent progress. **Blood**, v. 107, p. 4223–4233, 2006.

TAYLOR, S.; WAKEM, M.; DIJKMAN, G.; ALSARRAJ, M.; NGUYEN, M. A practical approach to RT-qPCR—Publishing data that conform to the MIQE guidelines. **Methods**, v. 50, p. S1–S5, 2010.

TIBBETTS, R.S.; CORTEZ, D.; BRUMBAUGH, K.M.; SCULLY, R.; LIVINGSTON, D.; ELLEDGE, S.J.; ABRAHAM, R.T. Functional interactions between BRCA1 and the checkpoint kinase ATR during genotoxic stress. **Genes & Development**, v. 14, n. 23, p. 2989–3002, 2000.

TIMMERS, C.; TANIGUCHI, T.; HEJNA, J.; REIFSTECK, C.; LUCAS, L.; BRUUN, D.; THAYER, M.; COX, B.; OLSON, S.; D'ANDREA, A.D.; MOSES, R.; GROMPE, M. Positional cloning of a novel Fanconi anemia gene, FANCD2. **Molecular Cell**, v. 7, p. 241–248, 2001.

TISCHKOWITZ, M.; XIA, B.; SABBAGHIAN, N.; REIS-FILHO, J.S.; HAMEL, N.; LI, G.; VAN BEERS, E.H.; LI, L.; KHALIL, T.; QUENNEVILLE, L.A.; OMEROGLU, A.; POLL, A.; LEPAGE, P.; WONG, N.; NEDERLOF, P.M.; ASHWORTH, A.; TONIN, P.N.; NAROD, S.A.; LIVINGSTON, D.M.; FOULKES, W.D. Analysis of P ALB2/F ANCN-associated breast cancer families. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 104, p. 6788–6793, 2007.

TOIKKANEN, S.; HELIN, H.; ISOLA, J.; JOENSUU, H. Prognostic significance of HER-2 oncoprotein expression in breast cancer: a 30-year follow-up. **Journal of Clinical Oncology**, v. 10, p. 1044–1048, 1992.

VAN DER GROEP, P.; HOELZEL, M.; BUERGER, H.; JOENJE, H.; DE WINTER,

J.P.; VAN DIEST, P.J. Loss of expression of FANCD2 protein in sporadic and hereditary breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 107, p. 41–47, 2008.

VANDESOMPELE, J.; DE PRETER, K.; PATTYN, F.; POPPE, B.; VAN ROY, N.; DE PAEPE, A.; SPELEMAN, F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology**, v. 3, 2002.

VAN WEZEL, T.; LOMBAERTS, M.; VAN ROON, E.H.; PHILIPPO, K.; BAELE, H.J.; SZUHAI, K.; CORNELISSE, C.J.; CLETON-JANSEN, A.M. Expression analysis of candidate breast tumour suppressor genes on chromosome 16q. **Breast Cancer Research**, v. 7, p. 998-1004, 2005.

VENKITARAMAN, A.R. Cancer susceptibility and the functions of BRCA1 and BRCA2. **Cell**, v. 108, n. 2, p. 171-182, 2002.

VENKITARAMAN, A.R. Tracing the network connecting BRCA and Fanconi anaemia proteins. **Nature Reviews Cancer**, v. 4, p. 266–276, 2004.

VERONESI, U.; GALIMBERTI, V.; ZURRIDA, S.; MERSON, M.; GRECO, M.; LUINI, A. Prognostic significance of number and level of axillary nodal metastases in breast cancer. **Breast**, v. 2, p. 224–228, 1993.

VIALE, G.; REGAN, M.M.; MAIORANO, E.; MASTROPASQUA, M.G.; DELL'ORTO, P.; RASMUSSEN, B.B.; RAFFOUL, J.; NEVEN, P.; OROSZ, Z.; BRAYE, S.; OHLSCHLEGEL, C.; THÜRLIMANN, B.; GELBER, R.D.; CASTIGLIONE-GERTSCH, M.; PRICE, K.N.; GOLDBIRCH, A.; GUSTERSON, B.A.; COATES, A.S. Prognostic and predictive value of centrally reviewed expression of estrogen and progesterone receptors in a randomized trial comparing letrozole and tamoxifen adjuvant therapy for postmenopausal early breast cancer: BIG 1-98. **Journal of Clinical Oncology**, v. 25, p. 3846–3852, 2007.

XIA, B.; SHENG, Q.; NAKANISHI, K.; OHASHI, A.; WU, J.; CHRIST, N.; LIU, X.; JASIN, M.; COUCH, F.J.; LIVINGSTON, D.M. Control of BRCA2 cellular and clinical functions by a nuclear partner, PALB2. **Molecular Cell**, v. 22, p. 719-729, 2006.
XIA, M.; SHERLOCK, J.; HEGERICH, P.; YOU, X.; LEE, K.; WALWORTH, C.; SPIER, E. **DataAssist™ – Data Analysis Software for TaqMan® Real-Time PCR Data**. IMECS – Hong Kong, 2010.

WANG, B.; HUROV, K.; HOFMANN, K.; ELLEDGE, S.J. NBA1, a new player in the Brca1 A complex, is required for DNA damage resistance and checkpoint control.

Genes & Development, v. 23, p. 729-739, 2009.

WANG, Z.; LI, M.; LU, S.; ZHANG, Y.; WANG, H. Promoter Hypermethylation of FANCF Plays an Important Role in the Occurrence of Ovarian Cancer through Disrupting Fanconi Anemia-BRCA Pathway. **Cancer Biology & Therapy**, v. 5, n. 3, p. 256-260, 2006.

WEINBERG, R.A. Tumor suppressor genes. **Science**, v. 245, p. 1138-1145, 1991.

YAMASHITA, T.; BARBER, D.L.; ZHU, Y.; WU, N.; D'ANDREA, A.D. The Fanconi anemia polypeptide FACC is localized to the cytoplasm. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 91, p. 6712-6716, 1994.

ZHANG, B.; CHEN, R.; LU, J.; SHI, Q.; ZHANG, X.; CHEN, J. Expression of FANCD2 in Sporadic Breast Cancer and Clinicopathological Analysis. **Journal of Huazhong University of Sciences and Technology (Medical Sciences)**, v. 30, n. 3, p. 322-325, 2010.

aZHANG, F., FAN, Q., REN, K.; ANDREASSEN, P.R. PALB2 functionally connects the breast cancer susceptibility proteins BRCA1 and BRCA2. **Molecular Cancer Research**, v. 7, p. 1110–1118, 2009.

bZHANG, F.; MA, J.; WU, J.; YE, L.; CAI, H.; XIA, B.; YU, X. PALB2 links BRCA1 and BRCA2 in the DNA-damage response. **Current Biology**, v. 19, p. 524–529, 2009.

APÊNDICES

1 MATERIAL E MÉTODOS.....	109
1.1 COLETA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS.....	109
1.1.1 Resumo dos grupos amostrais e experimentos realizados.....	110
1.2 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA.....	110
1.3 EXTRAÇÃO DO RNA TOTAL E TRANSCRIÇÃO REVERSA.....	114
1.4 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA.....	114
1.5 SELEÇÃO DOS GENES DE REFERÊNCIA.....	116
1.6 DETERMINAÇÃO DAS EFICIÊNCIAS DE REAÇÃO ATRAVÉS DA CONSTRUÇÃO DE CURVAS PADRÃO.....	119
1.7 ANÁLISE DA EXPRESSÃO PROTEICA POR <i>WESTERN-BLOTTING</i>	120
1.8 ANÁLISE DA EXPRESSÃO PROTEICA POR IMUNOFLUORESCÊNCIA....	121
1.9 ANÁLISE DE METILAÇÃO.....	122
1.10 ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE.....	122
1.11 SILENCIAMENTO DO GENE <i>MTAP</i> EM LINHAGEM CELULAR.....	123
1.12 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	123
2 ANÁLISES DE ASSOCIAÇÃO ENTRE OS GENES <i>FA-BRCA</i> E OS PARÂMETROS HISTOPATOLÓGICOS DAS PACIENTES COM TUMORES IDC.....	125
3 IMUNOFLUORESCÊNCIA DA PROTEINA <i>MTAP</i> NAS LINHAGENS CELULARES DE CARCINOMAS MAMÁRIOS.....	126
4 TERMO DE CONSENTIMENTO DO HC E HNSG.....	127

1 MATERIAL E MÉTODOS

1.1 COLETA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

Amostras de carcinomas mamários esporádicos foram coletadas no Hospital Nossa Senhora das Graças (HNSG) e no Hospital de Clínicas (HC) da Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba, Paraná. As amostras de tecido não tumoral da mama contralateral de pacientes com câncer de mama foram coletadas durante a cirurgia para remoção do tumor primário quando acompanhada de cirurgia plástica reparadora. Todas as amostras foram obtidas com consentimento assinado pelas pacientes e aprovação pelo Comitê de Ética da UFPR. Os dados clínico-patológicos foram acessados pelo médico responsável. Foram obtidas 46 amostras de tumores mamários primários (vários subtipos) e dez amostras de tecido da mama contralateral, coletadas no momento do procedimento cirúrgico e imediatamente submersas em *RNAlater®* (Ambion Inc. Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) para preservação do RNA até o momento da extração. Estas amostras foram catalogadas no banco de dados do Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética (LABCHO) da UFPR e processadas manualmente para remoção do tecido não tumoral (no caso dos tumores), como tecido gorduroso, vasos sanguíneos, tecido estromal, utilizando pinças e tesouras esterilizadas e sobre placas de Petri descartáveis. O material foi fragmentado e estocado em mini-tubos descartáveis, sendo mantido congelado em freezer -80 °C até o momento da extração do RNA.

Um segundo grupo de 85 tumores mamários triplo-negativos (TNBC) e 66 tumores do tipo Luminal-A foi utilizado para a análise da expressão do gene *MTAP*. Estas amostras provenientes de *core-biopsy* foram obtidas no Departamento de Oncologia do Hospital de Cremona (*Azienda Ospedaliera "Istituti Ospitalieri" di Cremona*) (Lombardia, Itália), e não foi possível acessar os dados clínico-patológicos destas pacientes.

Foram utilizadas sete linhagens de carcinomas mamários, pertencentes ao Laboratório de *Farmacologia Molecolare* do *Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri* (Milão, Itália): MDA-MB-231, MDA-MB-435, MDA-MB-468, MCF7, SK-

BR-3, T47-D e ZR-75-1. As células foram mantidas em frascos com 5 ml de meio de cultura RPMI-1640 suplementado com 1% de L-glutamina (*Biowest, Nuaille, French*) e 10% de soro bovino fetal (*Sigma, St. Louis, MO*) a 37 °C e 5% de concentração de CO₂. Essas linhagens foram utilizadas para extração de ácidos nucleicos e proteínas e para os experimentos *in vitro* com os fármacos. As linhagens MCF-7 e T47-D são pouco invasivas, enquanto a linhagem MDA-MB-231 é altamente invasiva. As células foram destacadas dos frascos de cultura com tripsina 0,05% e EDTA em PBS 0,04% (*Biowest, Nuaille, French*) para os subcultivos ou experimentos. A contagem das células foi realizada utilizando o aparelho *Multisizer™ 3 COULTER COUNTER®* (*Beckman Coulter, Inc, Fullerton, CA, USA*).

1.1.1 Resumo dos grupos amostrais e experimentos realizados

a) Amostras de tecido tumoral (n=46) e não-tumoral (n=10)

Subgrupo de carcinomas ductais (n=35)

Amostra total classificada por subtipos intrínsecos (n=46)

Experimento: Expressão dos genes *FA-BRCA* e *MTAP*

b) Amostras de core-biopsy TNBC (n=85) e Luminal A (n=66)

Experimento: Expressão do gene *MTAP*

c) Linhagens celulares (n=7)

Experimentos: Expressão dos genes *MTAP* e *CDKN2A*; expressão protéica por WB e IMF; análise do status de metilação da região promotora de *MTAP*; silenciamento de *MTAP* por interferência de RNA (RNAi) e ensaios de citotoxicidade.

1.2 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

O QUADRO 01 apresenta as características das pacientes portadoras de carcinomas mamários esporádicos que cederam amostras de tecido para o estudo. Para algumas pacientes, não foi possível a obtenção de todas as informações

clínicas e histopatológicas através da análise dos laudos e prontuários médicos.

Subtipos Histológicos	n	%
IDC	36	78,26
ILC	03	6,52
Misto	04	8,70
Outros*	03	6,52
Subtipos Intrinsecos		
Luminal-A	23	54,80
Luminal-B	14	33,30
ERBB2+	02	4,80
TNBC	03	7,10
Não-informado	04	
Metástases em Linfonodos		
Presente	21	48,84
Ausente	22	51,16
Não-informado	03	
Grau Tumoral		
I	06	13,64
II	28	63,64
III	10	22,72
Não-informado	02	
Tamanho do Tumor		
≤ 20 mm	20	45,45
> 20 mm	24	54,55
Não-informado	02	
Receptor de Estrogênio (ER)		
Positivo	37	84,09
Negativo	07	15,91
Não-informado	02	
Receptor de Progesterona (PR)		
Positivo	38	86,36
Negativo	06	13,64
Não-informado	02	
Amplificação de <i>ERBB2</i>		
Positivo	09	21,43
Negativo	33	78,57
Não-informado	04	

QUADRO 01 – CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA.

FONTE: O autor (2013)

LEGENDA: IDC, Carcinoma Ductal Invasor; ILC, Carcinoma Lobular Invasor; *, outros subtipos (Carcinoma Invasor Mucinoso, Carcinoma Túbulo Lobular, Carcinoma Pleomórfico); TNBC, Carcinoma Triplo Negativo; mm, milímetros; n, tamanho amostral.

As informações clínicas e histológicas detalhadas para cada uma das pacientes estão descritas no QUADRO 02. As pacientes 27, 31 e 32 doaram concomitantemente amostras de tumor e de tecido não-tumoral da mama contralateral. As outras sete amostras de tecido não-tumoral da mama contralateral utilizadas não fazem parte do grupo de pacientes analisadas neste trabalho.

n	Idade	Diagnóstico	L	G	T	ER	PR	ERBB2		Tratamento
1	56	CDI SOE associado a CDIS comedocarcinoma com necrose	P	II	37	-	-	-	-	NADA
2	33	CDI	N	II	40	POS	POS	NEG	Luminal-A	FAC x 6 => Tmx
3	44	CDI bilateral	P	II	50	POS	POS	NEG	Luminal-A	AC x 4 => P x 12
4	56	CDI associado a CDIS sólido e cibriforme	N	II	27	POS	POS	NEG (1+)	Luminal-A	CMF x 8 =>Tmx
5	62	CDI	N	II	15	NEG	NEG	NEG	TNBC	NADA
6	72	CDI SOE	P	II	35	POS	POS	POS (2+)	Luminal-B	FAC x 6 => Tmx
7	67	CDI SOE	P	II	5	POS	POS	NEG (1+)	Luminal-A	Tmx
8	66	CDI com recidiva	P	I	20	POS	POS	POS (2+)	Luminal-B	AC x 4 => P x 12
9	67	CDI SOE associado a CDIS comedocarcinoma	P	III	50	POS	POS	NEG (1+)	Luminal-B	FAC x 4
10	35	CDI Medular	P	III	-	POS	POS	NEG	Luminal-B	AC x 4=> P x 12
11	44	CDI SOE	P	II	18	POS	POS	NEG	Luminal-A	AC x 4 => P x 12
12	57	CDI	N	II	20	POS	POS	POS (3+)	Luminal-B	FAC x 6 + Herceptin
13	72	CDI SOE associado a CDIS comedocarcinoma	N	II	24	POS	POS	NEG	Luminal-A	Tmx
14	48	CDI SOE	N	II	16	POS	POS	NEG (1+)	Luminal-A	CMF x 6
15	45	CDI SOE associado a CDIS	N	III	23	NEG	NEG	NEG	TNBC	TC x 4
16	45	CDI	N	I	5	POS	POS	POS (3+)	Luminal-B	Tmx
17	86	CDI associado a CDIS sólido	N	III	30	POS	POS	NEG	Luminal-B	IA
18	83	CDI Apócrino associado a CDIS comedocarcinoma e cibriforme	N	II	8	POS	NEG	NEG	Luminal-A	IA
19	31	CDI associado a CDIS sólido e comedocarcinoma	P	II	25	-	-	-	-	AC =>T
20	46	CD	N	I	17	POS	POS	NEG	Luminal-A	Tmx
21	49	CDI	N	II	40	POS	POS	NEG	Luminal-A	FAC x 6
22	71	CDI	N	I	10	POS	POS	NEG	Luminal-A	Tmx
23	74	CDI	N	III	35	NEG	POS	NEG (2+)	Luminal-B	IA
24	81	CDI	N	II	20	POS	POS	NEG (1+)	Luminal-A	Tmx
25	73	CDI	N	II	32	POS	POS	NEG	Luminal-A	Tmx
26	46	CDI associado a CDIS sólido e cibriforme	P	III	40	POS	POS	NEG	Luminal-B	AC x 4 => P x 12
27	39	CDI	P	II	18	POS	POS	NEG	Luminal-A	AC x 4 => P x 12
28	49	Carcinoma Multifocal, a maior lesão sendo CDI associado a CMI	P	III	60	POS	POS	NEG (1+)	Luminal-B	AC x 4 => P x 12
29	89	CDI	P	III	60	NEG	NEG	POS (2+)	ERBB2+	Tmx
30	39	CDI SOE associado a CDIS	P	II	80	NEG	NEG	-	-	AC x 4 =>P x 4

n	Idade	Diagnóstico	L	G	T	ER	PR	ERBB2		Tratamento
31	61	CDI	N	II	20	POS	POS	NEG	Luminal-A	IA
32	84	CDI	P	III	35	NEG	NEG	POS (3+)	ERBB2+	NADA
33	81	CDI	N	II	40	POS	POS	NEG	Luminal-A	Tmx
34	58	CDI	P	III	17	POS	POS	NEG	Luminal-B	TC x 4=>IA
35	42	CDI	N	II	30	POS	POS	NEG (2+)	Luminal-A	AC x 4 => P x 12
36	97	CDI	-	-	-	POS	POS	NEG	Luminal-A	-
37	47	CLI	P	I	25	POS	POS	NEG	Luminal-A	-
38	70	CLI associado à CLIS	P	II	80	NEG	NEG	NEG	TNBC	-
39	45	C misto Ductal e Lobular	P	II	35	POS	POS	NEG	Luminal-A	-
40	60	C misto Ductal e Lobular	P	II	10.5	POS	POS	NEG	Luminal-A	-
41	62	CM com área de CDI SOE	N	I	20	POS	POS	POS (3+)	Luminal-B	-
42	49	CTL	N	II	25	POS	POS	NEG	Luminal-A	-
43	78	C misto Ductal e Lobular associado a CDIS sólido cibriforme/CLI mama E	N	II	13	POS	POS	NEG	Luminal-A	-
44	52	CLI Pleomórfico Multifocal/ na mama D CDIS	P	II	20	POS	POS	POS (3+)	Luminal-B	-
45	59	C Pleomórfico	-	-	13	POS	POS	-	-	-
46	59	C misto Ductal e Lobular	-	II	15	POS	POS	POS (3+)	Luminal-B	-

QUADRO 02 - INFORMAÇÕES CLÍNICAS E HISTOPATOLÓGICAS DAS PACIENTES

FONTE: O autor (2013).

LEGENDA: n, número sequencial da amostra; idade, idade ao diagnóstico em anos; L, metastases nos linfonodos axilares; P, metastases axilares positivas; N, metastases axilares negativas; G, grau histológico do tumor; I, grau 1; II, grau 2; III, grau 3; T, tamanho do tumor em mm; ER, status do receptor de estrogênio por IHQ; PR, status do receptor de progesterona por IHQ; ERBB2, amplificação do gene ERBB2 por IHQ e teste complementar por FISH; POS, positivo; NEG, negativo; Diagnóstico: CDI, Carcinoma Ductal Invasor; SOE, sem outra especificação; CDIS, Carcinoma Ductal *in situ*; CD, Carcinoma Ductal; CMI, Carcinoma Micropapilar Invasor; CLI, Carcinoma Lobular Invasor; CLIS, Carcinoma Lobular *in situ*; C, Carcinoma; CM, Carcinoma Mucinoso; CTL, Carcinoma Tubular Invasor; E, mama esquerda; D, mama direita; Tratamento (adjuvante): FAC, 5-fluorouracil, Doxorrubicina e Ciclofosfamida; Tmx, Tamoxifeno; AC, Doxorrubicina e Ciclofosfamida; Herceptin, anticorpo monoclonal (Trastuzumabe); CMF, Ciclofosfamida, Metotrexato e Paclitaxel; TC, Docetaxel e Ciclofosfamida; IA, inibidores de aromatase, -, ausência de informação.

Não foi possível obter as informações clínicas e histopatológicas das pacientes com amostras de *core-biopsy*, provenientes de Cremona, Itália. Um estudo recente do nosso grupo de pesquisa (RIBEIRO *et al.*, 2013) utilizou o mesmo grupo amostral, com pequenas alterações (80 amostras de TNBC e 70 amostras de tumores Luminal-A), e apresenta a caracterização clínica e hispatológica das pacientes.

1.3 EXTRAÇÃO DO RNA TOTAL E TRANSCRIÇÃO REVERSA

O RNA total das amostras tumorais e da mama contralateral foi obtido utilizando o kit de extração de RNA *RNAeasy*® (*Qiagen, Hilden, Germany*), seguido de tratamento com *DNase* (a fim de evitar a contaminação com DNA), e foi posteriormente estocado a -80 °C. A retrotranscrição de 1200 ng de RNA para síntese de cDNA foi realizada com o kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription* (*Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*).

As amostras de *core-biopsy* foram previamente desparafinizadas em xileno, reidratadas por meio de duas lavagens em etanol absoluto e mantidas a 55 °C por dez minutos. O RNA total foi obtido utilizando o kit *High Pure RNA Paraffin* (*Roche, Branchburg, NJ, USA*), e aproximadamente 300 ng de RNA foi retro-transcrito através do kit *High Capacity cDNA Archive* (*Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*).

O RNA total das linhagens celulares foi obtido utilizando o kit *SV-Total RNA isolation system* (*Promega, Madison, WI, USA*), e cerca de 300 ng de RNA foi retro-transcrito com o kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription* (*Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*).

Aproximadamente 200 ng dos RNAs obtidos foram aplicados em gel de agarose 2,0% e corados com brometo de etídeo, para análise da integridade. Um RNA íntegro apresenta duas bandas visíveis, referentes aos rRNA 28S e 18S, presentes nas células eucarióticas. As concentrações dos RNAs foram determinadas utilizando o espectrofotômetro *Nanodrop*® (*Thermo Scientific, Wilmington, MA, USA Scientific Inc.*), e a partir delas foram preparadas soluções de trabalho a 120 ng/μl.

1.4 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA

As reações de RT-qPCR foram realizadas nos equipamentos *Mastercycler ep RealPlex* (*Eppendorf, Hamburg, Germany*) (para as amostras de carcinomas mamários esporádicos e tecido não-tumoral) e *ABI Prism 7900 Sequence Detection System* (*Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*) (para as amostras de *core-*

biopsy e linhagens celulares), com o protocolo *SYBR Green* (*Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*). A análise da expressão gênica por Quantificação Relativa foi realizada pelo Método do $\Delta\Delta Ct$. Nesta metodologia, a concentração relativa é dada pelas fórmulas:

$$\Delta Ct = Ct \text{ gene alvo} - Ct \text{ gene de referência}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct - \Delta Ct \text{ amostra calibradora}$$

A expressão do gene alvo na amostra em relação à amostra calibradora é obtida pela fórmula:

$$2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Curvas-padrão para cada um dos genes foram elaboradas para a análise das eficiências de reação (E), necessárias ao Método do $\Delta\Delta Ct$. Em 10 μ l de volume de reação, foram adicionados 2 μ l de cDNA molde (15 ng), 2 pmol dos primers *forward* e *reverse* e 5 μ l de *SYBR Green* (*Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*). Os programas de PCR foram padronizados conforme o QUADRO 03.

Reagentes	Volume na reação (μ l)	Concentração total na reação
Água ultra-pura	2,6	
Iniciador <i>forward</i> (10 pmol/ μ l)	0,2	2,0 pmol
Iniciador <i>reverse</i> (10 pmol/ μ l)	0,2	2,0 pmol
<i>SYBR green PCR Master Mix</i>	5,0	
cDNA (7,5 ng/ μ l)	2,0	15,0 ng
	T = 10,0	
Temperatura de hibridização dos iniciadores dos genes alvos	59,3 °C para o gene <i>PALB2</i> , e 63,2 °C para os genes <i>FANCA</i> , <i>FANCC</i> , <i>FANCD2</i> , <i>FANCF</i> , <i>BRCA1</i> , <i>MTAP</i> e <i>CDKN2A</i> (as temperaturas de hibridização foram determinadas através da utilização de um gradiente de temperatura no termociclador)	
Programa de PCR	2 min a 50 °C 10 min a 95 °C 15 seg a 95 °C e 1 min a 59,3 °C ou 63,2 °C (40 X) Curva de dissociação (pré-programada)	

QUADRO 03 – PADRONIZAÇÃO DA REAÇÃO DE RT-qPCR.

FONTE: O autor (2013)

LEGENDA: pmol, pico molar; μ l, micro litro; ng, nano gramas, T, volume total; °C, graus Célsius.

As sequências dos iniciadores para os genes alvos foram obtidas conforme as especificações necessárias para análises de RT-qPCR e contemplando as regiões de junções de éxons, com auxílio dos *softwares* PRIMER-3 (Disponível em: http://frodo.wi.mit.edu/cgi.bin/primer3/primer3_www.cgi) e *Oligo Analyzer* (Disponível em: <http://www.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer/>) (QUADRO 04).

Gene	Direção	Sequência	Tamanho (pb)
BRCA1	F	5'- GCCAGAAAACACCACATCAC	99
	R	5'- CAGTGTCCGTTTCACACACAA	
FANCA	F	5'- GAGGTTCTTCAGTCATACCCTGA	84
	R	5'- TCTCTCTGCATCTGAACAGCA	
FANCC	F	5'- CCAGCCAGAGTTCTTTGAGG	90
	R	5'- CGAAGCCAGAGGCAGACTAC	
FANCD2	F	5'- CCCATCTGCTATGATGATGAA	81
	R	5'- CGTATTTGCTGAGGGGATATG	
FANCF	F	5'- GCTAGTCCACTGGCTTCTGG	95
	R	5'- GGTGGCGGCTAGTCACTAAA	
PALB2	F	5'- TGGGACCCTTTCTGATCAAC	83
	R	5'- GGGGCATCAAAAATTGGTTT	
CDKN2A	F	5'-ACCAGAGGCAGTAACCATGC	100
	R	5'-AAGTTTCCCGAGGTTTCTCA	
MTAP	F	5'- CCACCGCCGTGAAGATTGGAA	103
	R	5'- GGCTTGCCAAATGGAGTATCCAC	

QUADRO 04 – SEQUÊNCIA DOS INICIADORES *FOWARD* E *REVERSE* PARA OS GENES ALVOS E DE REFERÊNCIA.

FONTE: O autor (2013).

LEGENDA: F, *foward*; R, *reverse*; Tamanho, tamanho em pares de bases do produto amplificado; pb, pares de bases.

Após a análise das temperaturas de dissociação dos genes, foi comparada a expressão dos genes alvos entre as amostras tumorais (IDC) e não-tumorais, Luminal-A e Luminal-B, Luminal-A e TNBC (*core-biopsy*). Também foram feitas comparações entre os subgrupos tumorais, determinados em relação ao tamanho do tumor, *status* dos receptores hormonais (triplo negativos, *ERBB2* positivos e negativos, ER/PR positivos e negativos), grau histológico (I, II e III) e *status* dos linfonodos axilares (com e sem metástases).

1.5 SELEÇÃO DOS GENES DE REFERÊNCIA

É importante validar os genes de referência em cada sistema experimental, a fim de aumentar a confiabilidade nas diferenças de expressão que são detectadas (SORBY *et al.*, 2010). Estudos de Radonic *et al.* (2004); Kok, Roelofs e Glesendorf (2005) e Rubie, Kempf e Hans (2005) tentaram descrever genes de referência estáveis universalmente para diversos tipos de tumores. Entretanto, trabalhos recentes (CARADEC, SIRAB e KEUMEUGNI, 2010) mostram que genes estáveis em um tipo tumoral não necessariamente serão estáveis em outro tipo. Estas

variações são observadas inclusive entre experimentos diferentes para um mesmo tipo tumoral (DYDENSBORG *et al.*, 2006; KHEIRELSEID *et al.*, 2010). Portanto, os genes de referência devem ser validados e selecionados em cada experimento para cada tipo de tecido.

Neste estudo foi utilizado o ensaio com cartão microfluídico de 384 poços *Taq Man Low Density Endogenous Control Panel* (TLDA – *Taq Man Low Density Array*) (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Este cartão contém ensaios de expressão em triplicatas para 16 genes de referência comumente utilizados (QUADRO 05), e comporta cDNA de 8 amostras, juntamente com *Taq Man Universal Master Mix* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) em um volume final de 100 µl (que serão distribuídos em 48 poços). A leitura foi realizada no aparelho *ABI Prism 7900HT Fast Real time PCR System* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), utilizando o seguinte programa de PCR: dois minutos a 50 °C, dez minutos a 94 °C e 40 ciclos de 30 segundos a 97 °C, seguidos de um minuto a 60 °C. Foram utilizadas cerca de 500 ng de cDNA de 5 amostras de tumores de mama e três amostras de tecido não tumoral da mama (contralateral). A placa foi analisada utilizando os softwares *SDS v2.3 for the 7900HT Fast Real Time PCR System* e *RQ Manager v1.2* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Os resultados foram analisados no software *DataAssist*® v. 3.0 (Disponível em http://marketing.appliedbiosystems.com/mk/get/DATAASSIST_SOFTWARE_LOGIN, que gera um score de estabilidade para cada gene candidato baseado nos valores de desvio padrão. A pontuação de cada gene de referência candidato ou selecionado é a variação média deste gene com todos os outros candidatos (VANDESOMPELE *et al.*, 2002). Os genes mais estáveis são os que apresentam os menores scores, e neste estudo foram *B2M*, *PPIA*, *IPO8* e *ACTB*.

Nome do Gene	Símbolo	ID	Tamanho (pb)
18S Ribosomal RNA	18S	Hs99999901_s1	187
Phosphoglycerate Kinase-1	PGK1	Hs99999906_m1	75
B-Actin	ACTB	Hs99999903_m1	171
Polymerase (RNA) II polypeptide A	POLR2A	Hs00172187_m1	61
Beta-2-microglobulin	B2M	Hs99999907_m1	75
Peptidyl-prolyl isomerase/ciclophylin A	PPIA	Hs99999904_m1	98
Glyceraldehyd-3-phosphate dehydrogenase	GAPDH	Hs99999905_m1	122
Acidic ribosomal phosphoprotein P0	RPLP0	Hs99999902_m1	105
B-Glucuronidase	GUSB	Hs99999908_m1	81
Transcription factor IID, TATA box binding protein	TBP	Hs99999910_m1	127
Hydromethylbilane synthase	HMBS	Hs00609297_m1	64
Transferrin receptor (p90, CD71)	TFRC	Hs99999911_m1	105
Hypoxanthine-phosphoribosyl-transferase 1	HPRT1	Hs99999909_m1	100
Ubiquitin C	UBC	Hs00824723_m1	71
Importin 8	IPO8	Hs00183533_m1	71
Tyrosine 3 monooxygenase activation protein, zeta polypeptide	YWHAZ	Hs00237047_m1	70

QUADRO 05 – GENES DE REFERENCIA CANDIDATOS INCLUIDOS NO ENSAIO TAQ MAN ENDOGENOUS CONTROL PANEL.

FONTE: O autor (2013).

LEGENDA: ID, identificação; pb, pares de bases.

Os genes selecionados para utilização neste estudo foram *B2M* e *ACTB*, que apresentaram *scores* baixos. Os iniciadores para o gene *B2M* foram obtidos a partir do trabalho de FU *et al.*, 2010. O QUADRO 06 apresenta as sequências dos iniciadores dos genes de referência selecionados.

Gene	Direção	Sequência	Éxon	Tamanho (pb)	Tm °C
B2M	F	5'- TGACTTTGTACAGCCCAAGATA	2	77	56,3
	R	5'- CGGCATCTTCAAACCTCCA	3		55,2
ACTB	F	5'- GATGCAGAAGGAGATCACTGC	5	75	63,9
	R	5'- AGTACTTGCGCTCAGGAGGA	6		64,0

QUADRO 06 – SEQUÊNCIA DOS INICIADORES FORWARD E REVERSE DOS GENES DE REFERÊNCIA SELECIONADOS.

FONTE: O autor (2013).

LEGENDA: F, *forward*; R, *reverse*; Tamanho, tamanho em pares de bases do produto amplificado; pb, pares de bases; Tm °C, temperatura de *melting* em graus Celsius.

Todos os iniciadores dos genes referências, assim como dos genes alvos, foram desenhados e testados conforme as condições adequadas para utilização em reações de RT-qPCR (BUSTIN *et al.*, 2009; TAYLOR *et al.*, 2010). Os produtos de PCR devem apresentar entre 75 e 150 pb de comprimento. Os iniciadores devem apresentar proporção de guanina e citosina (GC) entre 50% e 60%, temperatura de hibridização entre 55 °C e 65 °C e não devem formar estruturas secundárias.

Corroborando a nossa seleção, Morse *et al.* (2005) avaliaram a estabilidade de seis genes comumente usados como controles endógenos em quatro linhagens de carcinomas mamários, e observaram os genes *ACTB*, *PPIA* e *GAPDH* como os

menos variáveis. Kheirelseid *et al.* (2010) escolheram os genes *B2M* e *PPIA* como a combinação mais estável de genes de referência em um experimento com carcinomas colorretais, a partir de um painel com iniciadores para 13 genes de controle endógeno comumente utilizados e com base nos logaritmos de estabilidade *GeNorm*, *NormFinder* e *qBasePlus*.

1.6 DETERMINAÇÃO DAS EFICIÊNCIAS DE REAÇÃO ATRAVÉS DA CONSTRUÇÃO DE CURVAS PADRÃO

Na quantificação relativa a expressão de um determinado gene alvo é obtida em relação a uma amostra de referência, sendo o Método do $\Delta\Delta C_t$ o mais indicado para estudos de expressão com vários genes alvos. Normalmente neste método é feita a comparação entre a variação de C_t de dois grupos amostrais (teste e referência). A curva padrão não é necessária para a quantificação, mas deve ser construída para a validação dos ensaios de RT-qPCR através da determinação da eficiência de reação para cada um dos genes do experimento (alvos e referências) (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001; SCHMITTGEN *et al.*, 2008). As eficiências das reações foram calculadas conforme a fórmula proposta por Meijerink *et al.* (2001):

$$\text{Eficiência} = 10^{-(1/\text{slope})} - 1$$

Para a construção das curvas padrão foi realizada uma pré-amplificação nas condições padronizadas, com os iniciadores específicos para cada um dos genes. Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2,0% a 80 volts por 50 minutos. O gel foi corado com Brometo de Etídeo 0,1% e as bandas referentes aos produtos foram recortadas do gel com auxílio de bisturi e lâmina estéreis no transiluminador de luz UV. Os produtos amplificados foram purificados através do Kit *AxyPrep DNA Gel Extraction*[®] (Axygen Biosciences, Union City, CA, USA), conforme condições do fabricante. A concentração obtida pela purificação foi determinada utilizando o aparelho *Nanodrop*[®] 2000 (Thermo Scientific, Wilmington, MA, USA) e então foram realizadas cinco diluições seriadas na ordem de dez vezes. Os valores de *slope*, intercessão com o eixo Y, eficiência de

reação e R^2 , estão apresentados no QUADRO 07.

Genes	<i>Slope</i>	Intercessão com eixo Y	Eficiência de Reação	R^2
<i>FANCA</i>	-3,340	14,48	0,99	0,998
<i>FANCC</i>	-3,346	38,29	0,99	0,998
<i>FANCD2</i>	-3,362	51,81	0,98	1,000
<i>FANCF</i>	-3,438	49,63	0,95	0,998
<i>BRCA1</i>	-3,369	49,43	0,98	0,996
<i>PALB2</i>	-3,347	51,01	0,99	0,999
<i>MTAP</i>	-3,430	49,31	0,96	0,998
<i>ACTB</i>	-3,380	11,36	0,98	0,999
<i>B2M</i>	-3,461	51,65	0,94	1,000

QUADRO 07 – DADOS DE *slope*, EFICIÊNCIA DE REAÇÃO E R^2 PARA AS CURVAS PADRÃO CONSTRUÍDAS PARA VALIDAÇÃO DOS EXPERIMENTOS COM OS GENES ALVOS E REFERÊNCIAS.

FONTE – O autor (2013).

Para utilização do Método de $\Delta\Delta Ct$ (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001), os valores de R^2 entre cada gene alvo e referência devem ser muito próximos entre si (com variação entre -0,1 e 0,1) e próximos a um (100%). Os dados de validação dos ensaios estão apresentados no QUADRO 08.

Genes	<i>FANCA</i>	<i>FANCC</i>	<i>FANCD2</i>	<i>FANCF</i>	<i>BRCA1</i>	<i>PALB2</i>	<i>MTAP</i>
<i>ACTB</i>	0,065	0,0485	0,0252	0,18532	0,0046	0,0311	0,0899
<i>B2M</i>	0,0156	0,0074	0,0067	0,0004	0,0062	0,0071	0,0017

QUADRO 08 – VALORES DA VARIAÇÃO DE R^2 PARA VALIDAÇÃO DAS REAÇÕES DE RT-qPCR PARA OS GENES ALVOS E REFERÊNCIAS.

FONTE: O autor (2013).

NOTA: em negrito o valor superior ao limite aceito para a validação.

Conforme os resultados do teste de validação, o gene de referência *ACTB* foi excluído dos experimentos de expressão do gene *FANCF*, devido ao valor de R^2 ser superior a 0,1.

1.7 ANÁLISE DA EXPRESSÃO PROTEICA POR WESTERN-BLOTTING

Os extratos proteicos das linhagens de carcinomas mamários foram obtidos incubando os *pellets* de células por 30 minutos em solução de lise contendo 10 mM de Tris-HCl (pH 7,4), 150 mM de NaCl, 0,1% NP-40, 5 mM de EDTA e 50 mM de NaF, na presença de inibidores de protease. As amostras foram centrifugadas a

1.3000 × g por dez minutos a 4 °C, e o conteúdo proteico do sobrenadante foi determinado usando o corante *Bio-Rad Protein assay* (*Bio-Rad, Hercules, CA, USA*). Géis de SDS-poliacrilamida a 12% foram utilizados para separação das proteínas (50 µg a 100 µg) a 15 mA, com a subsequente transferência para membranas de nitrocelulose ou PVDF (*Schleicher & Schuell BioScience GmbH, Whatman Group, Dassel, Germany*). Após a saturação das membranas por uma hora com solução de leite a 5% em tampão TBST, foi realizada a hibridização (18 horas) com anticorpos anti-CDKN2A (C-20), anti-MTAP (N-20) e β-tubulina (H-235) (1:200, 1:100 e 1:500 na solução de saturação, respectivamente) obtidos de *Santa Cruz Biotechnology* (*California, CA, USA*). As membranas foram posteriormente hibridizadas por uma hora com os respectivos anticorpos secundários (1:3000 na solução de saturação, *Santa Cruz Biotechnology, California, CA, USA*) e, após diversas lavagens em tampão TBST, foram reveladas usando o kit *ECL* (*Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden*). As massas moleculares das proteínas β-tubulina, MTAP e CDKN2A são 55, 31 e 16 kDa, respectivamente.

1.8 ANÁLISE DA EXPRESSÃO PROTEICA POR IMUNOFLUORESCÊNCIA

Para as análises por imunofluorescência, 3–4 × 10⁴ células das linhagens de carcinomas mamários cresceram por 48 horas sobre lâminas de poli-lisina, e foram fixadas com 4% de paraformaldeído por 20 minutos, seguido de permeabilização com Triton X-100 (0,5% em PBS) por cinco minutos e saturação com BSA 2% e Triton X-100 0,2% por cinco minutos. As células foram incubadas (18 horas) com anticorpo primário policlonal anti-MTAP (N-20, *Santa Cruz Biotechnology, California, CA, USA*) diluído 1:50 em tampão de saturação, seguido de incubação por uma hora com o anticorpo secundário específico conjugado com o fluoróforo Alexa 488 (*Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA*), diluído 1:800 em tampão de saturação. As células foram incubadas por cinco minutos com corante DAPI (*Sigma, St. Louis, MO*, concentração final de 30 ng/ml em PBS) para coloração dos núcleos, as lâminas foram preparadas com 7 µl de Vectashield® H-1000 (*Vector Laboratories, California, CA, USA*) e posteriormente observados em microscópio invertido com fluorescência IX81® (*Olympus Inc., Tokyo, Japan*). Estes

experimentos foram repetidos quatro vezes.

1.9 ANÁLISE DE METILAÇÃO

DNA genômico foi isolado das linhagens celulares de carcinomas mamários utilizando o *kit* de purificação de DNA *Maxwell® 16 Cell* (*Promega, Madison, WI, USA*). Um micrograma do DNA foi modificado com bissulfito de sódio usando o *kit Epitect Bisulfite* (*Qiagen, Hilden, Germany*), de acordo com as especificações da empresa. As reações de PCR metilação-específica (MS-PCR) ocorreram em condições padrão utilizando *taq* DNA polimerase (*GoTaq® Hot Start, Promega, Madison, WI, USA*) e 2 µL de DNA modificado, em um volume total de 25 µL. Os seguintes pares de iniciadores foram utilizados: MTAP metilado forward 5'-TGTTTTTTAGGAATTAAGGGAAATAC-3', MTAP metilado reverse 5'-AACTACAAAATCTAACCCGACGAC-3', MTAP não-metilado forward 5'-TTTTTAGGAATTAAGGGAAATATGT-3', MTAP não-metilado reverse 5'-CAACTACAAAATCTAACCCAACAAC-3', resultando em produtos de PCR de 199/197 pb, respectivamente. As reações foram incubadas inicialmente a 94 °C por três minutos, seguindo-se 35 ciclos a 94 °C por 30 segundos, 52 °C por 30 segundos e 72 °C por 30 segundos. A extensão final ocorreu a 72 °C por cinco minutos. Os produtos de PCR foram separados em gel de agarose 2,5% com *Gel Red™* 10,000X (*Biotium, San Francisco, CA, USA*) 1:15.000. Estes experimentos foram repetidos duas vezes.

1.10 ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE

Para os ensaios de citotoxicidade *in vitro*, 3-4 x 10⁴ células/ml foram cultivadas, e após 48 horas tratadas com 5'aza-deoxicitidina (AZA), metotrexato (MTX) e 5-FU, a uma concentração final de 100 µM, 50 µM e 10 µM, respectivamente. Estes fármacos foram selecionados devido à sua ação como inibidores da biossíntese de purinas. A proliferação celular foi quantificada após 72 horas do tratamento em um leitor de placas de Elisa *TECAN® Infinite 200* (*TECAN*

Group Ltd., Männedorf, Switzerland), usando o ensaio MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium). 15 μ l da solução de MTS foram adicionados à cada um dos poços das placas de tratamento, incluindo uma coluna com o corante apenas, para avaliação da coloração basal. As placas foram encubadas em estufa por quatro horas, seguida da leitura das colorações. Estes experimentos foram repetidos quatro vezes.

1.11 SILENCIAMENTO DO GENE *MTAP* EM LINHAGEM CELULAR

A inativação gênica RNAi foi realizada utilizando moléculas interferentes do tipo esiRNA (*endoribonuclease prepared siRNAs*) em uma linhagem celular positiva para o gene *MTAP* (MDA-MB-435). A confirmação do silenciamento foi feita por PCR em tempo real e *western blotting*. A molécula esiRNA contra *MTAP*, e uma molécula não específica utilizada como controle (*scrambled*) foram obtidas comercialmente (*Eupheria Biotech, Sigma, St. Louis, MO*). Cinquenta microlitros da cultura celular foram cultivados em placa de cultura de 96 poços a uma concentração de 4.0×10^4 células/ml, no dia anterior da transfecção. Quarenta e cinco nanomoles de aliquotas de esiRNA ou controle, em cinco replicatas, foram misturados com 5 μ l do meio de cultura Opti-MEM e com 5 μ l da solução de transfecção, composta de meio Opti-MEM e 0.1 μ l de lipofetamina (*LipofectamineTM 2000, Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA*). Setenta e duas horas após a transfecção, as células foram tratadas durante 72 horas com concentrações crescentes dos fármacos AZA, MTX e 5-FU. No final dos tratamentos, a viabilidade celular foi visualizada pelo ensaio de MTS, como descrito anteriormente. Estes experimentos foram repetidos duas vezes.

1.12 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados de expressão gênica foram obtidos com o *software DataAssist[®]* através do Método do $\Delta\Delta$ Ct (XIA *et al.*, 2010). Os valores normalizados foram avaliados pelo teste de normalidade Shapiro-Wilk, não apresentando na maior parte

dos casos uma distribuição normal. Para avaliar a expressão dos genes nos diversos grupos (tumores e não-tumores, tumores luminal-A e luminal-B, tumores luminal-A e TNBC, linfonodos com e sem metástases, graus histológicos, ER positivo e negativo, PR positivo e negativo, ERBB2 positivo e negativo), foram utilizados os testes t e de Mann-Whitney, nos casos de distribuição normal e não-normal, respectivamente. Um teste de regressão linear foi utilizado para correlacionar a expressão gênica com a idade das pacientes e com o tamanho tumoral. O nível de significância considerado foi de 5%. Todas as análises foram realizadas com o auxílio do *software Prism 5* versão 5.04 (*GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA*).

2 ANÁLISES DE ASSOCIAÇÃO ENTRE OS GENES *FA-BRCA* E OS PARÂMETROS HISTOPATOLÓGICOS DAS PACIENTES COM TUMORES IDC

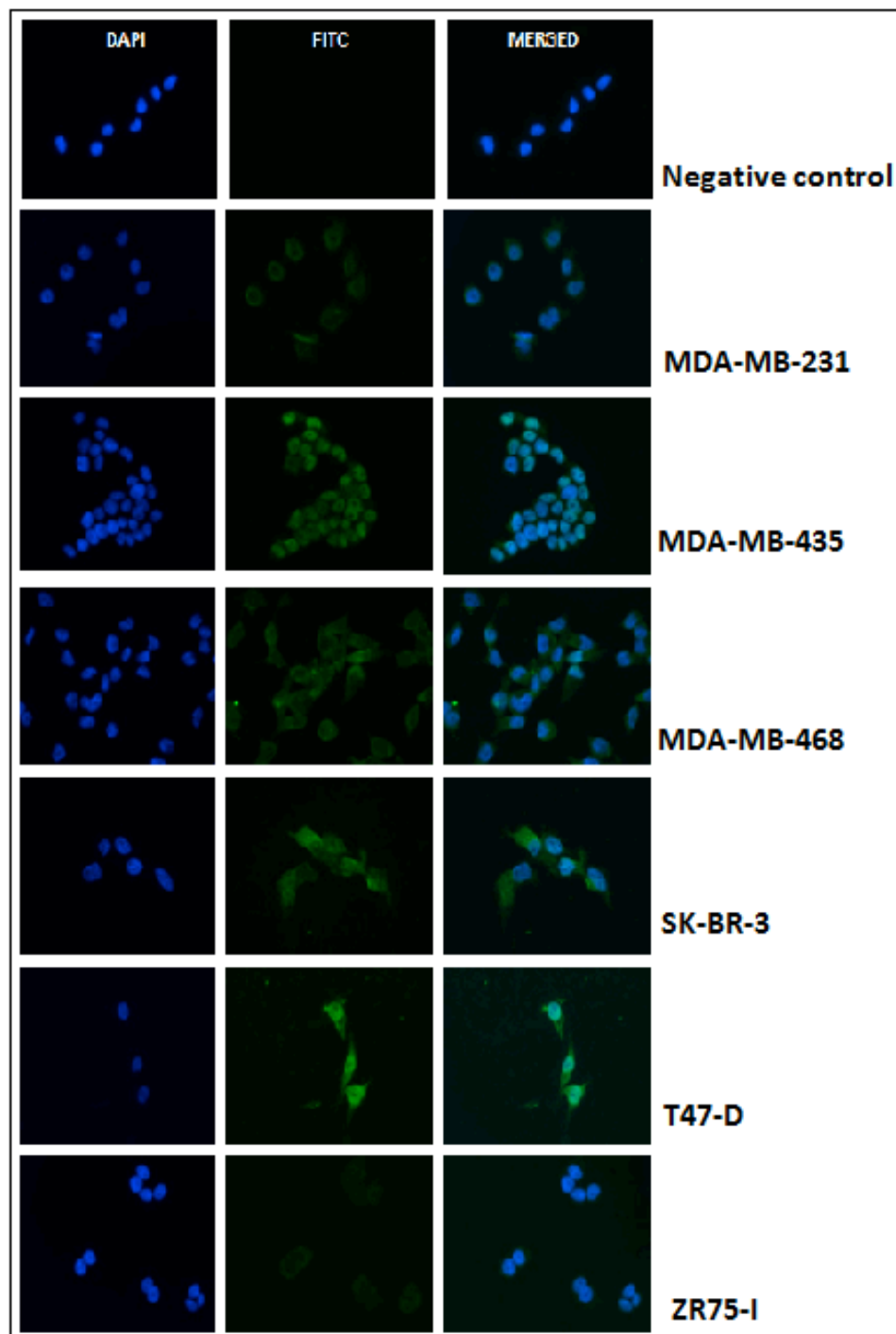
		<i>FANCA</i>	<i>FANCC</i>	<i>FANCD2</i>	<i>FANCF</i>	<i>BRCA1</i>	<i>PALB2</i>
Metástases em linfonodos	n	34	34	35	34	34	35
	FC	0.74	0.84	0.69	1.29	1.20	0.73
	<i>p</i>	0.36	0.64	0.09	0.89	0.68	0.10
Grau	N	34	34	35	34	34	35
	FC	0.79	1.23	0.80	1.70	2.54	1.45
	<i>p</i>	0.17	0.86	0.41	0.10	0.19	0.18
ER	n	32	32	33	32	32	33
	FC	0.93	1.13	1.50	1.25	2.75	1.64
	<i>p</i>	0.75	0.28	0.22	0.08	0.11	0.08
PR	n	32	32	33	32	32	33
	FC	1.14	1.15	1.26	1.17	3.17	1.57
	<i>p</i>	0.75	0.18	0.47	0.24	0.03	0.12
ERBB2	n	31	31	32	31	32	32
	FC	0.55	0.97	0.60	0.61	0.67	1.02
	<i>p</i>	0.35	0.20	0.08	0.26	0.26	0.90
Tamanho do tumor	n	33	33	34	33	33	34
	<i>p</i>	0.12	0.15	0.22	0.16	0.75	0.83
Idade	n	33	33	34	33	33	34
	<i>p</i>	0.88	0.90	0.87	0.80	0.15	0.22

FONTE: O autor (2013).

Nota: Os resultados estatisticamente significativos estão apresentados em negrito.

Legenda: n, tamanho amostral; FC, fold change; *p*, valor de probabilidade; ER, receptor de estrogênio; PR, receptor de progesterona

3 IMUNOFLOURESCÊNCIA DA PROTEINA MTAP NAS LINHAGENS DE CARCINOMAS MAMÁRIOS



FONTE: O autor (2013).

NOTA: Na primeira coluna as lâminas foram incubadas com DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol), para coloração dos núcleos. Na segunda coluna as lâminas foram incubadas com anticorpo-secundário FITC (Isotiocianato de Fluoresceína) específico para MTAP. Na terceira coluna as imagens de DAPI e FITC foram sobrepostas. Os dados de imunofluorescência corroboram os dados de *western-blotting*.

4 TERMO DE CONSENTIMENTO DO HC E HNSG

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Concordo em participar livremente deste estudo, entendendo que serei entrevistado e submetido a uma avaliação laboratorial (exame de sangue). E, entendendo que os riscos de minha participação nesta pesquisa são mínimos.

Entendo que minha participação é inteiramente voluntária, podendo me recusar a responder qualquer questão ou retirar o meu consentimento em participar neste estudo a qualquer hora, sem nenhum prejuízo ao meu tratamento atual ou futuro.

Eu, _____, após ter lido e entendido todas as informações e esclarecido todas as minhas dúvidas referentes a este estudo, concordo voluntariamente em participar do mesmo. Atesto também o recebimento das “Informações ao doador”, necessário para a minha compreensão do estudo.

_____ Data: __/__/__

Assinatura (do doador ou responsável) ou impressão datiloscópica

Eu, Prof. Dr. Iglenir João Cavalli, declaro que forneci todas as informações referentes ao estudo ao doador.

_____ Data: __/__/__

Prof. Dr. Iglenir João Cavalli